



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

ESTUDO COMPARATIVO DAS ALTERAÇÕES CLÍNICAS E LABORATORIAIS EM
CANÍDEOS MONO-INFECTADOS COM *LEISHMANIA INFANTUM* VERSUS
CANÍDEOS CO-INFECTADOS COM *LEISHMANIA INFANTUM* E COM *BABESIA*
CANIS, *EHRlichia CANIS* E/OU *RICKETTSIA CONORII*

MARIA CATARINA COSTA MENDONÇA DE AGUIAR

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI:

Doutora Isabel Maria Soares Pereira
da Fonseca de Sampaio
Doutora Yolanda Maria Vaz
Doutora Maria Manuela Grave
Rodeia Espada Niza

ORIENTADOR:

Doutora Maria Manuela Grave
Rodeia Espada Niza

2011

LISBOA



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

ESTUDO COMPARATIVO DAS ALTERAÇÕES CLÍNICAS E LABORATORIAIS EM
CANÍDEOS MONO-INFECTADOS COM *LEISHMANIA INFANTUM* VERSUS
CANÍDEOS CO-INFECTADOS COM *LEISHMANIA INFANTUM* E COM *BABESIA*
CANIS, *EHRlichia CANIS* E/OU *RICKETTSIA CONORII*

MARIA CATARINA COSTA MENDONÇA DE AGUIAR

Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI:

Doutora Isabel Maria Soares Pereira
da Fonseca de Sampaio
Doutora Yolanda Maria Vaz
Doutora Maria Manuela Grave
Rodeia Espada Niza

ORIENTADOR:

Doutora Maria Manuela Grave
Rodeia Espada Niza

2011

LISBOA

*os meus Pais, por todo o amor e dedicação,
e por sempre acreditarem em mim.*

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Maria Manuela Grave Rodeia Espada Niza, pela oportunidade de estagiar na AZEVET, pela experiência e conhecimentos partilhados, pela disponibilidade, orientação e apoio ao longo deste percurso.

À Dra. Ivana Coimbra, pelo exemplo de profissionalismo, pela humanidade e amizade, pela transmissão de confiança e serenidade necessárias à prática da minha vida futura.

À Dra. Helena Guerreiro, pelos conhecimentos partilhados na área dos novos animais de companhia, pelo seu particular bom humor e pelo exemplo de coragem e determinação.

Ao Dr. Rui Lemos Ferreira, pelo seu constante interesse e prazer em ensinar, pelo estímulo e incentivo ao estudo e pelo modelo de profissionalismo.

À Equipa de auxiliares da AZEVET, Paula, Sílvia e Rita, pelo exemplo de vida, pelos bons momentos e simpatia de todos os dias, e, acima de tudo, pelo bom acolhimento, entreajuda e familiaridade com que me receberam.

À Dra. Leonor Ramalho, pela ajuda, apoio e incentivo durante a realização deste trabalho.

Ao Professor Doutor Luís Cardoso, pela pronta disponibilidade na cedência de artigos científicos.

Aos meus Pais, por todas as oportunidades proporcionadas ao longo da minha vida, pela transmissão de valores e princípios que definem quem sou, e por todo respeito, apoio e amor. Obrigada por me incentivarem a querer ser sempre melhor.

À minha irmã Filipa, pela grande amizade, respeito e preocupação. Obrigada por me fazeres sentir sempre segura.

À minha sobrinha, Leonor, pelo sorriso sincero e genuíno.

À minha Família, um sincero obrigado por todos os momentos passados e pelo apoio nas diversas fases da minha vida.

À Catarina Bolotinha, por ser uma grande amiga e conselheira.

Á Inês Moutinho, Luís Lagoa, Patrícia Paredes, Rita Furtado, Madalena Centeno, Ana Maria Azevedo, Mafalda Gonçalves e restantes amigos, pela amizade, ajuda e apoio. Obrigada por terem tornado todo este percurso académico mais fácil e agradável.

RESUMO

A Leishmaniose Canina é uma doença sistémica grave, crónica, debilitante e potencialmente fatal, provocada por um protozoário difásico, a *Leishmania infantum*. É endémica em grande parte do território de Portugal Continental e nos últimos anos têm-se assistido a um aumento da sua prevalência nos cães. É transmitida ao hospedeiro vertebrado através da picada do insecto vector, *Phlebotomus perniciosus*.

As doenças transmitidas por vectores constituem um grupo de doenças infecciosas caracterizadas, muitas vezes, por sintomatologia inespecífica e semelhante entre as diferentes doenças e o seu diagnóstico pode ser um desafio. As co-infecções podem explicar, em parte, os casos de sintomatologia atípica, agravamento do quadro clínico e casos de insucesso à terapêutica instituída.

Com esta dissertação pretendeu-se avaliar se os sinais clínicos, as alterações do hemograma e do proteinograma apresentam semelhanças entre canídeos mono-infectados com *Leishmania infantum* e canídeos co-infectados com *Leishmania infantum* e com pelo menos um dos seguintes agentes patogénicos: *Babesia canis*, *Ehrlichia canis* e/ou *Rickettsia conorii*.

Foi realizado um estudo retrospectivo observacional, em 35 cães com diagnóstico clínico e serológico de leishmaniose e/ou hemoparasitas. Os animais foram divididos em dois grupos de acordo com a positividade serológica: Grupo A, constituído por 17 animais mono-infectados com *Leishmania infantum* e, Grupo B, constituído por 18 animais co-infectados a *Leishmania infantum* e pelo menos um dos seguintes agentes patogénicos: *Babesia canis*, *Ehrlichia canis* e *Rickettsia conorii*.

Este estudo revelou que as principais alterações clínicas e alterações laboratoriais, a nível do hemograma e do proteinograma, são semelhantes em canídeos mono-infectados com leishmaniose e nos canídeos co-infectados com *Leishmania* e hemoparasitas.

A identificação de infecções concomitantes nos canídeos com leishmaniose é essencial na medida em que o seu reconhecimento e posterior tratamento poderão ter repercussões importantes quer na qualidade de vida dos animais infectados quer a nível do prognóstico e evolução clínica da leishmaniose.

Palavras-Chave: *Leishmania infantum*, *Babesia canis*, *Ehrlichia canis*, *Rickettsia conorii*, Cão, Co-infecção.

ABSTRACT

Canine Leishmaniasis is a severe systemic, chronic, debilitating and potentially fatal disease caused by a diphasic protozoan, *Leishmania infantum*. It is endemic in much of Portugal mainland showing in recent years an increase in its prevalence in dogs. It is transmitted to the vertebrate host through the bite of the insect vector, *Phlebotomus perniciosus*.

The vector-borne diseases are a group of infectious diseases characterized often by nonspecific symptoms and similar between the different diseases and its diagnosis can be a challenging task. The co-infections may explain, in part, cases of atypical symptoms, aggravation of the clinical cases and the failure of therapy.

The aim of this thesis is to assess whether the clinical signs, changes in the protein profile and blood count show similarities between canine mono-infected with *Leishmania infantum* and canine co-infected with *Leishmania infantum* and at least one of the following pathogens: *Babesia canis*, *Ehrlichia canis* and/or *Rickettsia conorii*.

A retrospective observational study was conducted in 35 dogs with clinical and serological diagnosis of Leishmaniasis and/or Hemoparasites. The animals were divided into two groups according its sero-positivity: Group A, consisting of 17 animals mono-infected by *Leishmania infantum*, and Group B consisting of 18 animals co-infected with *Leishmania infantum* and at least one of the following pathogens: *Babesia canis*, *Ehrlichia canis* and *Rickettsia conorii*.

This study revealed that the clinical and laboratory changes at the CBC and protein profile are similar in dogs mono-infected with canine Leishmaniasis and those co-infected with Leishmaniasis and Hemoparasites.

The identification of concomitant infections in canine Leishmaniasis is essential to the extent that their recognition and subsequent treatment may have important implications both in quality of life of infected animals at the prognosis and clinical evolution of Leishmaniasis.

Keywords: *Leishmania infantum*, *Babesia canis*, *Ehrlichia canis*, *Rickettsia conorii*, Dog, Co-infection.

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	ii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT	v
ÍNDICE GERAL	vi
NOTA INTRODUTÓRIA	1
CAPÍTULO I – ENQUADRAMENTO TEÓRICO	3
1. LEISHMANIOSE CANINA	3
1.1. ETIOLOGIA e EPIDEMIOLOGIA	3
1.2. CICLO DE VIDA e PATOGENIA	4
1.3. QUADRO CLÍNICO e LESIONAL.....	6
1.4. PATOLOGIA CLÍNICA	9
1.5. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL.....	9
1.6. TRATAMENTO.....	10
2. BABESIOSE CANINA.....	13
2.1. ETIOLOGIA e EPIDEMIOLOGIA	13
2.2. CICLO DE VIDA e PATOGENIA	14
2.3. QUADRO CLÍNICO e LESIONAL.....	15
2.4. PATOLOGIA CLÍNICA	16
2.5. DIAGNÓSTICO.....	17
2.6. TRATAMENTO.....	18
3. EHRLICHIA CANIS.....	18
3.1. ETIOLOGIA e EPIDEMIOLOGIA	18
3.2. CICLO DE VIDA e PATOGENIA	19
3.3. QUADRO CLÍNICO e LESIONAL.....	20
3.4. PATOLOGIA CLÍNICA	22
3.6. TRATAMENTO.....	23
4. RICKETTSIA CONORII	24
4.1. ETIOLOGIA e EPIDEMIOLOGIA	24
4.2. CICLO DE VIDA e PATOGENIA	25
4.3. QUADRO CLÍNICO e LESIONAL.....	26
4.4. PATOLOGIA CLÍNICA	27
4.5. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL.....	27
4.6. TRATAMENTO.....	27
5. INFECÇÕES CONCOMITANTES	27

CAPÍTULO II - METODOLOGIA	30
1. Tipo de Estudo.....	30
2. População	30
3. Variáveis	31
4. Verificação de Hipóteses	33
5. Técnicas de tratamento de dados	33
6. Limitações do Estudo	35
CAPÍTULO III – RESULTADOS	36
1. Descrição dos dois grupos segundo a raça, sexo, idade e peso	36
2. Descrição dos dois grupos segundo o quadro clínico.....	37
3. Descrição dos dois grupos segundo os resultados dos exames laboratoriais	40
3.1. Hematologia	40
3.2. Bioquímicas sanguíneas	42
3.3. Proteinograma.....	42
3.4. Diagnóstico serológico e variação sazonal	42
4. Verificação de Hipóteses:.....	44
4.1. Hipótese 1 – Os sinais clínicos dos animais do grupo A (mono-infectados) são iguais aos dos animais do grupo B (co-infectados)	44
4.2. Hipótese 2 – O resultados do hemograma dos animais do grupo A (mono-infectados) são iguais aos dos animais do grupo B (co-infectados)	46
4.3. Hipótese 3 – Os resultados do proteinograma dos animais do grupo A (mono-infectados) são iguais aos dos animais do grupo B (co-infectados).....	48
CAPÍTULO IV	50
1. DISCUSSÃO	50
2. CONCLUSÃO.....	59
CAPÍTULO V - Descrição Das Actividades Realizadas Em Estágio	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Mapa de prevalência da Leishmaniose canina em Portugal.....	4
Figura 2 - Caixa de bigodes da variável idade nos dois grupos.....	36
Figura 3 - Caixa de bigodes da variável peso nos dois grupos	37
Figura 4 – Distribuição das principais alterações clínicas segundo os dois grupos	38
Figura 5 - Caixa de bigodes da variável temperatura rectal nos dois grupos	39
Figura 6 - Frequência das associações de co-infecções presentes no grupo B	43
Figura 7 - Distribuição sazonal nos dois grupos	44
Figura 8 – a) e b) Gráfico de erro e caixa de bigodes da temperatura rectal nos dois grupos.	45
Figura 9 - a) e b) Gráfico de erro e caixa de bigodes da variável hemoglobina	47
Figura 10 - a) e b) Gráfico de erro e caixa de bigodes da variável plaquetas	47
Figura 11 - a) e b) Gráfico de erro e caixa de bigodes da variável proteínas totais	49
Figura 12 – Distribuição dos animais por espécies	62

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Principais protocolos utilizados no tratamento da leishmaniose canina.....	12
Tabela 2 – Principais alterações laboratoriais nas diferentes fases clínicas	22
Tabela 3 – Fármacos utilizados no tratamento da erliquiose monocítica canina	24
Tabela 4 – Descrição de estudos realizados em cães com leishmaniose e co-infectados com outros agentes	29
Tabela 5 – Parâmetros do hemograma no Grupo A	40
Tabela 6 – Parâmetros do hemograma no Grupo B.....	41
Tabela 7 – Tabelas de contingência do tipo de infecção com as variáveis clínicas	44
Tabela 8 – Tabelas de contingência do tipo de infecção com as variáveis do hemograma.....	46
Tabela 9 – Tabelas de contingência do tipo de infecção com as variáveis do proteinograma .	49
Tabela 10 – Distribuição percentual das actividades realizadas durante o período de estágio	63
Tabela 11 – Distribuição percentual das cirurgias assistidas durante o período de estágio	64

ÍNDICE DE APÊNDICES

APÊNDICE I	76
APÊNDICE II	78
APÊNDICE III.....	80
APÊNDICE IV	85
APÊNDICE V.....	86
APÊNDICE VI	90
APÊNDICE VII – Actividades desenvolvidas durante o estágio curricular	92

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO I.....	96
ANEXO II.....	97
ANEXO III	98
ANEXO IV	99

LISTA DE ABREVIATURAS

° C	Graus Celsius
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
<i>B. canis</i>	<i>Babesia canis</i>
BID	A cada 12 horas
CHCM	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
<i>E. canis</i>	<i>Ehrlichia canis</i>
dL	Decilitro
FAS	Fosfatase alcalina
h	Hora
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
Hg	Hemoglobina
Htc	Hematócrito
IFI	Imunofluorescência indirecta
IFN γ	Interferão gama
IL 2	Interleucina 2
IL 4	Interleucina 4
IL 5	Interleucina 5
IL 6	Interleucina 6
IL 10	Interleucina 10
IL 12	Interleucina 12
IL 13	Interleucina 13
IM	Intra-muscular
IV	Intra-venoso
kg	Quilograma

mg	Miligrama
μL	Microlitro
μm	Micrometro
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PO	<i>per os</i> ; via oral
SID	A cada 24 horas
SC	Subcutânea
<i>R. rickettsi</i>	<i>Rickettsia rickettsi</i>
TID	A cada 8 horas
TNF α	Factor de necrose tumoral alfa
UI	Unidades Internacionais
VCM	Volume Corpuscular Médio
+	Positivo
-	Negativo
%	por cento

NOTA INTRODUTÓRIA

A Leishmaniose Canina é uma zoonose, endémica nos países da Bacia Mediterrânea, América do Sul e em grande parte de Portugal Continental. Nos últimos anos tem-se verificado um aumento da prevalência desta doença nos cães. É uma doença sistémica de curso clínico crónico potencialmente fatal e que apresenta grande variabilidade clínica. O agente etiológico, *Leishmania infantum*, é transmitido pela picada do mosquito vector, *Phlebotomus perniciosus*.

A Leishmaniose é uma doença de elevada prevalência em Portugal (Observatório Nacional de Leishmanioses [ONLeish], 2008) e por isso constitui motivo de consulta frequente nas clínicas veterinárias, quer como primeiras consultas quer como consultas de seguimento para tratamento das complicações e avaliação da evolução da doença.

O estágio curricular decorreu na AZEVET – Clínica Veterinária, localizada no distrito de Setúbal, que segundo o Observatório Nacional de Leishmanioses é a zona de Portugal com maior prevalência de leishmaniose canina. Nas consultas realizadas durante o estágio observou-se um número elevado de casos de canídeos infectados com *Leishmania infantum*, *Babesia canis*, *Ehrlichia canis* e *Rickettsia conorii* o que era previsível tendo em conta a localização da clínica (meio rural). De uma forma geral, os cães que recorrem à consulta vivem em zonas rurais, e por isso passam muito tempo ao ar livre e estão potencialmente mais expostos aos vectores, do que os cães residentes em áreas urbanas. Na prática diária constatou-se que os quadros clínicos das diferentes doenças referidas eram muito semelhantes e, por sugestão da Professora Doutora Maria Manuela Grave Rodeia Espada Niza (orientadora de formação), considerou-se pertinente como tema de investigação verificar se em cães infectados com leishmaniose a existência de co-infecção com outros agentes constituiria ou não um factor de agravamento do quadro clínico e laboratorial.

Esta dissertação tem como objectivo avaliar se os sinais clínicos, as alterações do hemograma e do proteinograma apresentam semelhanças entre canídeos mono-infectados com *Leishmania infantum* e canídeos co-infectados com *Leishmania infantum* e com pelo menos um dos seguintes agentes patogénicos: *Babesia canis*, *Ehrlichia canis* e/ou *Rickettsia conorii*. No Capítulo I descrevem-se os aspectos principais relacionados com cada uma das afecções nomeadamente, caracterização do agente etiológico, epidemiologia, ciclo de vida do parasita, patogenia, quadro clínico e lesional, patologia clínica, diagnóstico laboratorial e tratamento. Neste capítulo aborda-se ainda, de uma forma breve, a problemática das infecções concomitantes em canídeos infectados com leishmaniose. No capítulo II descreve-se a

metodologia utilizada, formulam-se as hipóteses de investigação e identificam-se as limitações do estudo. No capítulo III apresentam-se os resultados e no capítulo IV a discussão e as conclusões. No capítulo V descrevem-se as actividades realizadas durante o estágio curricular.

Este estudo permitiu constatar que as alterações clínicas e laboratoriais em cães infectados com *Leishmania infantum* e cães infectados com *Leishmania infantum* e com pelo menos um dos seguintes agentes, *Babesia canis*, *Ehrlichia canis* e *Rickettsia conorii* são semelhantes. Estes resultados podem ter consequências na prática veterinária, nomeadamente a nível da importância do diagnóstico de infecções concomitantes em cães com leishmaniose, não propriamente por estas afectarem o quadro clínico da doença, mas pelas consequências positivas que o seu tratamento pode determinar na evolução clínica da doença e na qualidade de vida do animal infectado.

CAPÍTULO I – ENQUADRAMENTO TEÓRICO

1. LEISHMANIOSE CANINA

1.1. ETIOLOGIA e EPIDEMIOLOGIA

A leishmaniose canina é uma doença sistémica grave, crónica e zoonótica, provocada por um protozoário difásico do género *Leishmania* (Baneth, 2006). Este parasita pertence ao Reino Protista, sub-reino *Protozoa*, Filo *Sarcomastigophora*, sub-filo *Mastigophora*, ordem *Kinetoplastidae*, sub-ordem *Trypanosomatina* e família *Trypanosomatidae* (Moreno, Nieto & Hernández, 1999).

Estes protozoários são transmitidos pela picada de fêmeas de insectos do género *Phlebotomus*, das espécies *P. perniciosus* e *P. ariasi*, na Europa e *Lutzomyia* na América do Sul (Alvar, Cañate, Molina, Morano & Nieto, 2004). A leishmaniose é endémica em 88 países – 66 países do Velho Mundo (Sudoeste da Europa, Norte de África, Médio Oriente, Índia, Bangladesh e China) e em 22 países do Novo Mundo (América do Sul e do Norte) (Roze, 2005; Baneth, 2006).

Existem cerca de 30 espécies diferentes de *Leishmania* dispersas pelos países do Velho e Novo Mundo (Baneth, 2006). Na Europa, a espécie mais frequente é a *Leishmania infantum*, tendo a sua maior expressão na região da Bacia Mediterrânea (Ferrer, Juanola, Ramos & Ramis, 1991; Amusategui, Sainz, Rodriguez & Tesouro, 2003; Corrales, 2007). Nesta zona, a seroprevalência varia entre 10 e 37% (Baneth, Day, Roura & Shaw, 2005). Campino et al (1995), e Pereira (2008) relatam a existência de três focos endémicos em Portugal: Região de Alto Douro, Região Metropolitana de Lisboa, que inclui o Parque Natural da Arrábida, e Região do Algarve. Com base em estudos de seroprevalência já realizados em Portugal Continental, podem ser consideradas como zonas endémicas a região de Trás-os-Montes e Alto Douro, a sub-região da Cova da Beira, o concelho da Lousã, a região de Lisboa e Setúbal, o concelho de Évora e o Algarve (ONLeish, 2008). A Figura 1 mostra a distribuição da prevalência da Leishmaniose em Portugal, segundo o Observatório Nacional das Leishmanioses (ONLeish).

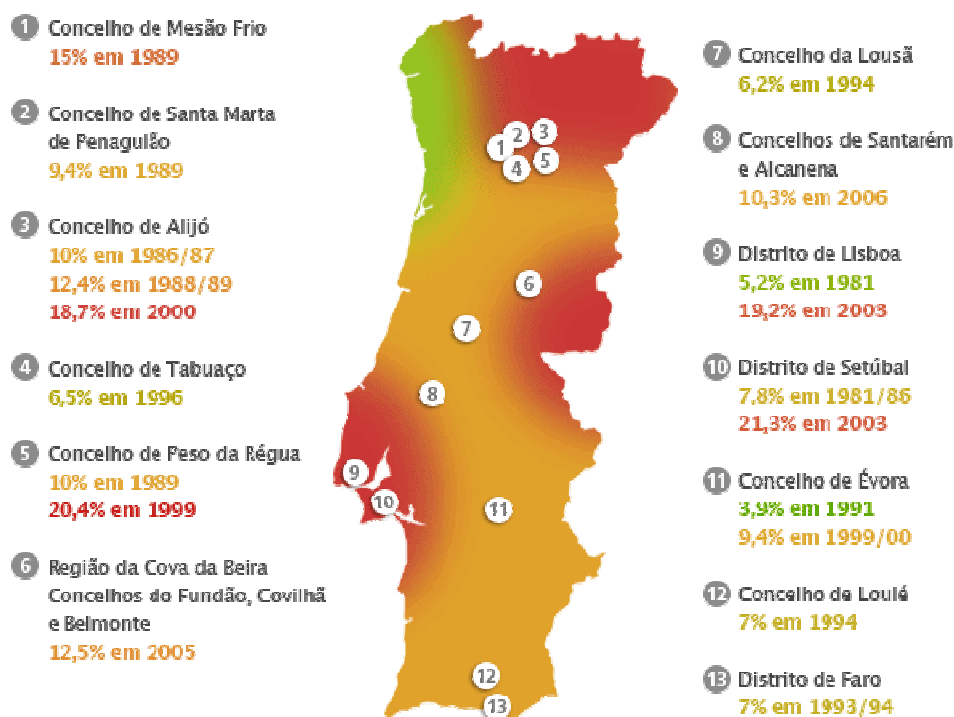


Figura 1 – Mapa de prevalência da Leishmaniose canina em Portugal

Fonte: ONLeish

De acordo com os dados do Observatório Nacional das Leishmanioses, os concelhos com maior prevalência desta doença são Setúbal (21,3%), Peso da Régua (20,4%), Lisboa (19,2%), Alijó (18,7%) e Mesão Frio (15%).

1.2. CICLO DE VIDA e PATOGENIA

O ciclo de vida natural da *Leishmania* envolve dois hospedeiros diferentes, um insecto vector e um hospedeiro vertebrado. A forma flagelada e extracelular, a promastigota, é encontrada no insecto vector. No hospedeiro vertebrado o parasita é observado intracelularmente, particularmente nos macrófagos, na sua forma aflagelada, a amastigota (Noli, 1999; Roze, 2005; Baneth, 2006; Tomás & Romão, 2008). O cão doméstico (*Canis familiaris*) é considerado o hospedeiro natural e reservatório de *Leishmania infantum* (Abranches, Silva-Pereira, Conceição-Silva, Santos-Gomes & Janz, 1991; Alvar et al, 2004; Baneth, 2006). O vector biológico é um insecto do género *Phlebotomus*, cuja actividade é maioritariamente crepuscular ou nocturna (Baneth, 2006; Afonso & Alves-Pires, 2008). Na zona Mediterrânea, o insecto encontra-se activo principalmente nos meses quentes, desde a Primavera até ao Outono (Baneth, 2006).

O flebótomo infecta-se ao ingerir sangue do hospedeiro vertebrado com macrófagos infectados com amastigotas de *Leishmania* (Afonso & Alves-Pires, 2008). Durante as primeiras horas estas depositam-se no intestino, onde se multiplicam activamente por divisão binária (Moreno et al., 1999; Baneth, 2006) e se diferenciam numa forma extracelular flagelada, a promastigota. Estas formas flageladas são inoculadas na pele do hospedeiro vertebrado através da picada do flebótomo (Alexandre-Pires & Correia, 2008). São, posteriormente, fagocitadas por células dendríticas e macrófagos da pele para o interior de um fagossoma, onde em menos de 24 horas perdem o flagelo e se diferenciam em amastigotas (Moreno, et al., 1999; Baneth, 2006). No hospedeiro multiplicam-se activamente por divisão binária e, eventualmente, provocam a ruptura dos macrófagos. As formas amastigotas livres são depois fagocitadas por outros macrófagos, disseminando, assim, a infecção (Baneth, 2006).

Alguns autores defendem que a patogenia da leishmaniose depende sobretudo duma resposta inadequada do sistema imunitário (Ferrer, 2002a; Baneth, 2006; Miranda, Roura, Picado, Ferrer & Ramis, 2008), visto que nem todos os cães infectados, natural ou experimentalmente, com *Leishmania* desenvolvem a doença. A resposta imunitária desenvolvida pelos canídeos no momento da infecção e posteriormente, parece constituir o factor mais importante no desenvolvimento da doença e da passagem de um estado assintomático para um sintomático.

O período de incubação desta parasitose pode variar de um mês até vários anos ou então nunca se revelar a doença (Kontos & Koutinas, 1993). Esta variabilidade depende da resistência e do tipo de resposta imunitária que o hospedeiro desenvolve, como referido anteriormente. O tipo de resposta imunológica do hospedeiro induz as células T-helper a produzirem determinadas citocinas, que vão activar mecanismos específicos, sendo estes determinantes na protecção imunológica ou na exacerbação da doença (Pinelli, Rutten & Ruitenberg, 1999).

Os cães clinicamente resistentes (Baneth, 2006) são aqueles capazes de contrariar a infecção através da sua resolução e eliminação do parasita ou, então, são capazes de a restringir permanecendo assintomáticos. Os animais resistentes desenvolvem uma resposta imunitária celular do tipo Th1 (Pinelli et al., 1994; 1999; Noli, 1999; Roze, 2005; Baneth, 2006) com produção de citocinas como IFN- γ , TNF- α , IL-2 e IL-12 (Pinelli, et al., 1994, 1999; Ciaramella & Corona, 2003b, Roze, 2005), que promovem a activação de células T CD4+ Th1 (resposta celular) e a activação dos macrófagos para destruição das formas amastigotas intracelulares (Pinelli, et al., 1994, Ferrer, 2000a, 2000b). Estes animais, quando infectados

pelo protozoário, não revelam presença de sinais clínicos ou então desenvolvem apenas ligeiros nódulos cutâneos no local da inoculação (Ferrer, 1999).

Os animais predispostos a desenvolver a infecção e a doença clínica são considerados clinicamente susceptíveis (Baneth, 2006) e manifestam uma resposta imunitária, predominantemente, humoral do tipo Th2 (Pinelli, et al., 1994; Noli, 1999; Roze, 2005; Baneth, 2006). Neste caso, existe supressão das células TCD4+Th1 e activação de células TCD4+Th2, produzindo IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 (Noli, 1999; Roze, 2005; Corrales, 2007). Estas citocinas inibem a activação dos macrófagos e as respostas linfoproliferativas, promovendo a proliferação de células B e subsequente produção, exagerada, de anticorpos anti-*Leishmania* não protectores (Pinelli, et al., 1994; Baneth, 2006) com posterior formação de complexos imunes circulantes (Ferrer, 2000a; Ciaramella & Corona, 2003b; Corrales, 2007). A deposição destes complexos imunes na membrana basal de vários órgãos pode promover glomerulonefrite, vasculite, poliartrite, uveíte e produção de auto-anticorpos contra plaquetas e eritrócitos (Castagnaro, et al., 2007). Além disto, nestes animais com resposta predominantemente humoral, existe uma disseminação do parasita pelo organismo, diminuição das contagens de linfócitos T CD4+ e imunossupressão (Castagnaro, et al., 2007).

A susceptibilidade e a resistência à leishmaniose parece ter base genética (Baneth, 2006). Foi demonstrado que cães oriundos de zonas onde a doença é endémica, como os Podengos de Ibiza, revelam uma prevalência de leishmaniose mais baixa quando comparado com outras raças e foi demonstrado que esta raça desenvolve, predominantemente, uma resposta celular, e por isso protectora, contra a *Leishmania infantum* (Solano-Gallego, et al., 2000).

1.3. QUADRO CLÍNICO e LESIONAL

As manifestações clínicas da leishmaniose canina são muito variáveis em consequência da multiplicidade de mecanismos patogénicos, das respostas imunitárias individuais e do longo período de incubação, que pode variar de alguns meses até vários anos (Ferrer, 1999; Roura, Sanchez & Ferrer, 1999; Baneth, 2006).

Considerando o tempo de desenvolvimento da doença, alguns autores classificam a leishmaniose canina segundo três quadros clínicos: agudo, subclínico e crónico (Ciaramella & Corona, 2003b). Os casos agudos, que normalmente se acompanham com manifestações febris, são muito raros (Moreno, et al., 1999; Ciaramella & Corona, 2003b).

É, na maioria dos casos, uma doença de curso crónico, de instalação insidiosa, e com desenvolvimento progressivo da sintomatologia ao longo de meses (Baneth, 2006).

A base do quadro lesional é caracterizada por uma reação inflamatória crônica (Ferrer, et al., 1991) e proliferativa, com uma excessiva infiltração de células inflamatórias, como macrófagos, linfócitos e plasmócitos. As lesões mais importantes ocorrem ao nível dos rins, fígado, órgãos linfóides e pele (Pinelli, et al., 1994), contudo também se podem encontrar lesões oculares, ósseas, articulares e ao nível do sistema nervoso central (Moreno, et al., 1999).

Os canídeos infectados com leishmaniose, geralmente apresentam um quadro sintomatológico que consiste, principalmente, em alterações dermatológicas, perda de peso progressiva, diminuição do apetite, linfadenopatia (local ou generalizada), atrofia muscular, lesões oculares, epistáxis, alterações da locomoção, anemia e onicogribose (Ferrer, 1999; Koutinas, et al., 1999; Solano-Gallego, 2009; Baneth, 2010).

As alterações dermatológicas são as manifestações clínicas mais comuns da leishmaniose canina (Ferrer, 1999; Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008). Destacam-se como mais frequentes: a alopecia com descamação intensa, com início, habitualmente, na cabeça disseminando-se depois ao resto do corpo (Ferrer, Rabanal, Fondevila, Ramos & Domingo, 1988); as úlceras crônicas de difícil cicatrização, localizadas principalmente nos bordos das orelhas, nas proeminências ósseas, nas junções muco-cutâneas e nos membros (Ferrer, et al., 1988); e os nódulos múltiplos disseminados pelo corpo (Ferrer, et al., 1988; Ferrer, 1999; Noli, 1999; Baneth, 2006).

A linfadenopatia, local ou generalizada, é um dos sinais mais consistentes (Noli, 1999; Roze, 2005). Os linfonodos encontram-se hipertrofiados, lisos, indolores e de consistência aumentada (Roze, 2005; Baneth, 2006; Fonseca & Villa de Brito, 2008).

Segundo Roze (2005), as lesões oculares ocorrem em 25% dos casos, e envolvem, principalmente, o segmento anterior do olho (Noli, 1999; Ciaramella & Corona, 2003b; Komnenou & Koutinas, 2007). As mais frequentes são as conjuntivites, blefarites, queratites e uveítes (Ferrer, 1999; Ciaramella & Corona, 2003b; Baneth, 2006). Em estados avançados de doença ocular, podem surgir complicações como úlceras, queratoconjuntivite seca, glaucoma e panofthalmia (Noli, 1999; Roze, 2005).

A epistáxis, presente nalguns animais (Noli, 1999; Roze, 2005), é habitualmente unilateral e intermitente e, pensa-se que é provocada por lesões inflamatórias e ulcerativas da mucosa nasal (Noli, 1999; Fonseca & Villa de Brito, 2008) e alteração nos mecanismos de coagulação (Ferrer, 1999; Ciaramella & Corona, 2003b).

A nível hepático, a lesão mais característica é a hepatite crónica proliferativa (Noli, 1999). Em fases mais avançadas, estes fenómenos proliferativos agravam-se, e a infiltração celular já instalada torna-se excessiva e difusa ou com formação de granulomas (Ciaramella, et al., 1997; Ferrer, 1999; Koutinas, et al., 1999; Noli, 1999). As lesões de fígado levam ao aumento das enzimas hepáticas e, à manifestação de sintomatologia expressa por vômito, perda de peso, poliúria e polidipsia, ascite, entre outros (Noli, 1999; Corrales, 2007). Geralmente só se observa lesão hepática evidente nas fases terminais da doença (Ferrer, 1999).

Costa et al (2003) citados por Solano-Gallego et al (2009) referem que a leishmaniose canina está associada a uma elevada prevalência de insuficiência renal crónica e é a principal causa de morte nos animais infectados (Solano-Gallego, et al., 2009). As lesões histopatológicas renais mais frequentes são a glomerulonefrite, devida, maioritariamente, à deposição de complexos imunes (Roze, 2005; Félix et al., 2008), e a nefrite tubúlo-intersticial (Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008; Félix et al., 2008; Solano-Gallego, et al., 2009). Estas lesões evoluem e podem conduzir a uma insuficiência renal crónica, com aumento da ureia e creatinina sanguíneas e proteinúria grave (Ferrer, 1999; Noli, 1999).

Foram descritos, a nível do aparelho gastrointestinal, casos de colite ulcerativa crónica (Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008) com diarreia de intestino grosso, melena e enterite hemorrágica aguda (Ferrer, et al., 1991).

As lesões do aparelho músculo-esquelético não são muito frequentes (Noli, 1999), e traduzem-se em claudicação intermitente de um ou mais membros, dificuldades de locomoção, atrofia muscular, principalmente, devido a processos imunomediados de poliartrite e polimiosite, e lesões ósseas (Ferrer, 1999; Noli, 1999; Ciaramella & Corona, 2003b), podendo estar associadas a um quadro de astenia e prostração (Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008). A nível muscular, há uma acentuada atrofia generalizada, má condição corporal com as estruturas ósseas bem salientes, e em particular atrofia dos músculos temporais e masséteres causando a aparência típica de “cabeça de velha” (Noli, 1999; Ciaramella & Corona, 2003b; Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008). A atrofia muscular está associada ao aparecimento de polimiosite crónica, caracterizada pela infiltração de formas amastigotas do parasita, vasculite neutrofílica e complexos imunes no tecido muscular (Baneth, Koutinas, Solano-Gallego, Bourdeau & Ferrer, 2008).

1.4. PATOLOGIA CLÍNICA

O quadro sintomatológico da leishmaniose canina acompanha-se de uma série de alterações hematológicas e bioquímicas, que variam na sua apresentação e intensidade.

A alteração hematológica mais frequente num animal infectado com *Leishmania* é uma anemia normocítica e normocrômica (Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008), não regenerativa (Strauss-Ayali & Baneth, 2000; Ciaramella & Corona, 2003b). Pode ser agravada por hemorragia e hemólise imunomediada (Baneth, 2006). O animal pode ainda desenvolver trombocitopénia, devido à deposição de complexos imunes circulantes, aos auto-anticorpos anti-plaquetários ou à supressão da medula óssea (Baneth, 2006). Alterações inconstantes como leucopénia (Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008), provocada pela diminuição das populações de linfócitos, monócitos e eosinófilos, deve-se, em parte, à mobilização e sequestro de leucócitos em diferentes órgãos, como também, devido à infiltração medular pelo parasita que se traduz numa disfunção medular com diminuição da hematopoiese (Ferrer, 2002a; Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008).

As alterações bioquímicas frequentemente encontradas num animal infectado por *Leishmania infantum* são a hiperproteinémia (Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008), com hiperglobulinémia (beta e gama globulinas), e hipoalbuminémia (Koutinas, et al., 1999; Ciaramella & Corona, 2003b; Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008) que provoca uma diminuição do rácio albumina/globulinas (Ciaramella, et al., 1997; Koutinas, et al., 1999; Baneth, 2006).

A nível hepático, os valores das enzimas FAS, ALT e AST podem estar alterados se existir lesão hepática crónica (Moreno, et al., 1999; Baneth, 2006; Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008). No entanto, a lesão hepática não é, normalmente, grave tendo tendência a normalizar após o tratamento (Ciaramella & Corona, 2003).

Com a evolução da doença pode instalar-se uma insuficiência renal devido à deposição de complexos imunes (Baneth, 2006). Estes animais, nesta fase, apresentam os parâmetros da função renal aumentados, como a ureia e a creatinina (Moreno et al., 1999) e acentuada proteinúria (Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008). O rácio proteína/creatinina urinária permite quantificar o grau de proteinúria e avaliar o grau de lesão renal (Baneth, 2006).

1.5. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O diagnóstico laboratorial é essencial para o diagnóstico definitivo de leishmaniose (Ciaramella & Corona, 2003b). Este pode ser realizado com base em: observação do parasita

em esfregaços ou cortes histológicos de linfonodos, medula óssea ou baço; detecção de ADN parasitário; e detecção de anticorpos anti-*Leishmania* (Staruss-Ayali & Baneth, 2000; Roze, 2005; Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008).

A visualização directa dos amastigotas livres ou no interior dos macrófagos é a melhor forma de diagnóstico definitivo (Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008). Pode ser realizada em esfregaços obtidos por aspiração por agulha fina (PAFF) de linfonodos e/ou de medula óssea (Staruss-Ayali & Baneth, 2000; Ciaramella & Corona, 2003b), de nódulos cutâneos, e esfregaços por aposição de lesões cutâneas (Noli, 1999; Roze, 2005), posteriormente corados com coloração Giemsa ou outros métodos de coloração (Nelson & Couto, 2003). Possui excelente especificidade (100%), no entanto a sensibilidade é baixa (Noli, 1999; Roze, 2005; Baneth, 2006), variando de 50 a 70% em esfregaços de medula óssea e de 30% em esfregaços de linfonodos (Ciaramella, et al., 1997; Ferrer, 1999).

Técnicas de diagnóstico molecular, como a *polymerase chain reaction* (PCR), permitem amplificar e detectar quantidades mínimas de ADN parasitário (Ciaramella & Corona, 2003b; Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008). A PCR pode ser utilizada em qualquer tipo de amostra: pele, medula óssea, linfonodo ou sangue (Roze, 2005; Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008). O diagnóstico por PCR é rápido e apresenta elevadas sensibilidade e especificidade, próximas de 100% (Noli, 1999; Ciaramella & Corona, 2003b; Roze, 2005), no entanto não reflecte a gravidade da infecção (Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008).

A maioria dos cães com leishmaniose desenvolve uma resposta humoral específica, pelo que a serologia é muito utilizada no diagnóstico da doença. Os métodos serológicos, nomeadamente a imunofluorescência indirecta (IFI), detectam anticorpos circulantes anti-*Leishmania* (Roze, 2005). Possui sensibilidade de 80% e especificidade de 100% (Noli, 1999; Ciaramella & Corona, 2003b; Baneth, 2006).

A confirmação do diagnóstico de leishmaniose pode ser um desafio e, por essa razão, sempre que existe suspeita clínica deve ser realizada, idealmente, a pesquisa directa do parasita e testes serológicos ou moleculares (Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008).

1.6. TRATAMENTO

Ainda não existe um tratamento que assegure uma cura parasitológica de leishmaniose (Solano-Gallego, et al., 2009). O tratamento farmacológico, em regra geral, proporciona melhoria da sintomatologia clínica e diminuição dos títulos de anticorpos dos animais infectados (Ciaramella & Corona, 2003b; Roze, 2005; Meireles, 2008). A ineficácia do

tratamento pode estar relacionada com a localização intracelular dos parasitas (Ciaramella & Corona, 2003b), com a resistência do parasita aos fármacos utilizados, e à ausência de uma resposta imunitária celular que complemente a acção dos fármacos (Meireles, 2008).

Os compostos antimoniais pentavalentes, como antimoniato de meglumina (Glucantime®), são os fármacos de eleição no tratamento da leishmaniose canina (Noli, 1999; Ciaramella & Corona, 2003b; Meireles, 2008). Inibem selectivamente as enzimas (fosfofrutoquinase e piruvatodesidrogenase) responsáveis pela oxidação dos ácidos gordos e a glicólise parasitária (Baneth, 2006; 2010a), bloqueando o metabolismo do parasita (Baneth, 2006). A dose utilizada é de 100 mg/kg (Baneth, 2006; Solano-Gallego, et al., 2009), duas vezes ao dia (BID), via subcutânea (SC) (Baneth, 2006), com duração de 3 a 4 semanas (Baneth, 2006).

A miltefosina (Milteforan®) é um análogo fosfolípido com actividade leishmanicida (Meireles, 2008), que interfere na biossíntese de glicolípidos e glicoproteínas da membrana parasitária. A dose recomendada é de 2 mg/kg/dia, administrado por via oral (PO), durante 28 dias consecutivos (Meireles, 2008). Os efeitos secundários descritos incluem alterações do tracto gastrointestinal como vómito, diarreia e anorexia (Corrales & Moreno, 2006).

O alopurinol (Zyloric®), um análogo das purinas, tem actividade leishmanioestática (Corrales, 2007; Meireles, 2008). Induz alterações na síntese proteica da *Leishmania* inibindo o seu crescimento e a sua multiplicação (Baneth, 2006). Solano-Gallego (2009) recomendam utilizar a dose de 10 mg/kg, BID, PO, com duração de, pelo menos, 6 a 12 semanas. Tem como principais vantagens o seu baixo custo e a via de administração. No entanto, em terapêuticas longas, promove xantinúria e, conseqüente formação de urólitos de xantina (Ciaramella & Corona, 2003b).

A anfotericina B é um macrólide com actividade leishmanicida (Ciaramella & Corona, 2003a). Liga-se ao ergosterol presente na membrana celular do parasita, alterando a sua permeabilidade (Baneth, 2006). Devido aos seus efeitos secundários, como flebite, febre, vómito, glomerulonefrite, anafilaxia (Ciaramella & Corona, 2003a; Baneth, 2006), é usado apenas quando existe resistência aos antimoniais pentavalentes (Ciaramella & Corona, 2003a). A dose recomendada é de 0,5-0,8 mg/kg, IV lenta, duas ou três vezes por semana até se atingir uma dose acumulada de 8 a 15 mg/kg (Corrales, 2007; Solano-Gallego, 2009). Fármacos como o metronidazol, a espiamicina e a marbofloxacina são utilizados como terapêutica de 3ª linha (Solano-Gallego, et al., 2009)

A combinação de compostos antimoniais, como o antimoniato de meglumina (Glucantime®) e o alopurinol é considerada, actualmente, como a terapêutica mais eficaz e constitui a primeira linha de tratamento contra a doença (Roze, 2005; Solano-Gallego, 2009; Solano-

Gallego, et al., 2009), diminuindo a carga parasitária e melhoria clínica (Ciarlini, Valadares, Ikeda-Garcia, Marcondes & Lima, 2010).

Os fármacos mais comumente utilizados no tratamento da leishmaniose canina e os protocolos terapêuticos correntes estão descriminados na Tabela 1.

Protocolo	Fármacos	Dose	Ação terapêutica
1ª Linha	Glucantime® + Alopurinol	75-100 mg/kg + 10 mg/kg	Leishmanicida + leishmaniostático
2ª Linha	Miltefosina + Alopurinol	2 mg/kg + 10 mg/kg	Leishmanicida + leishmaniostático
	Alopurinol	10 mg/kg	Leishmaniostático
	Anfotericina B	0,5-0,8 mg/kg	Leishmanicida
3ª Linha	Metronidazol + Espiramicina	25 mg/kg + 150,000 UI	
	Marbofloxacina	2 mg/kg	

Tabela 1 – Principais protocolos utilizados no tratamento da leishmaniose canina. (Adaptado de Solano-Gallego, et al., 2009)

Antes de iniciar qualquer tipo de terapêutica, o médico veterinário deve fazer uma avaliação clínica do animal, tendo particular atenção à função renal uma vez que alguns dos fármacos utilizados no tratamento da leishmaniose canina são nefrotóxicos. Deve também explicar ao proprietário os custos e os cuidados associados ao tratamento e que o mesmo não é totalmente eficaz, uma vez que não assegura uma cura parasitológica mas apenas clínica.

Em Portugal, acaba de ser comercializada uma vacina canina adjuvada contra a *Leishmania infantum* (CaniLeish®) que tem como objectivo reduzir o risco de infecção activa e de doença clínica, após contacto com o agente etiológico (Committee for Medicinal Products for Veterinary Use [CMPVU], 2001). Deve ser administrada exclusivamente a cães serologicamente negativos para *Leishmania*, a partir dos seis meses de idade em três doses, com três semanas de intervalo e, posteriormente, recomenda-se a administração de uma dose única anual. Os efeitos adversos descritos incluem tumefacção, nódulo, eritema e dor no local de injeção, hipertermia, apatia e sintomas digestivos. Estes são ligeiros a moderados e desaparecem entre dois a quinze dias (CMPVU, 2011).

2. BABESIOSE CANINA

2.1. ETIOLOGIA e EPIDEMIOLOGIA

A babesiose canina é uma doença parasitária, provocada por um protozoário intra-eritrocitário obrigatório do género *Babesia* (Camacho, Pallas, Gestal, Guitián & Olmeda, 2001; Lobetti & Jacobson, 2001; Birkenheuer, 2004; Zygner, Rapacka, Gójska-Zygner, Dlugosz & Wedrychowicz, 2007b; Schoeman, 2009). A *Babesia sp.* tem distribuição mundial (Camacho, et al., 2001; Lobetti & Jacobson, 2001; Boozer & Macintire, 2003; Sá, et al., 2006; Gopegui, et al., 2007; Schoeman, 2009) e está envolvida na infecção de numerosas espécies de mamíferos domésticos e selvagens (Ozaki, 1996).

Babesia canis e *Babesia gibsoni* são os agentes etiológicos da doença que se encontram com mais frequência em canídeos domésticos (*Canis familiaris*) (Camacho, et al., 2001; Boozer & Macintire, 2003; Garcia, 2006). São classificados morfologicamente em grandes (*Babesia canis*) e pequenos (*Babesia gibsoni*) piroplasmas de acordo com as dimensões dos merozoítos, que variam de 3,0 a 5,0 µm e 0,5 a 2,5 µm, respectivamente (Boozer & Macintire, 2003; Irwin, 2009; Cardoso, et al., 2010). *Babesia canis* possui forma piriforme e, geralmente, os merozoítos são encontrados aos pares dentro dos eritrócitos, podendo apresentar até oito ou mais merozoítos no interior do mesmo eritrócito (Camacho, et al., 2001; Garcia, 2006).

Técnicas moleculares avançadas permitiram, através de testes serológicos e de sequenciação genética, a divisão da espécie *Babesia canis* em 3 subespécies distintas: *Babesia canis vogeli*, *Babesia canis canis*, *Babesia canis rossi* (Uilenberg, Franssen, Perié & Spanjer, 1989; Solano-Gallego, 2009). Estas subespécies morfologicamente idênticas, têm vectores e patogénese diferentes: *B. canis vogeli*, pouco patogénica, é transmitida pelo ixodídeo *Rhipicephalis sanguineus* e é encontrada na Ásia, Austrália, Europa, África, América do Sul e do Norte; *B. canis canis*, moderadamente patogénica, tem como vector o ixodídeo *Dermacentor reticulatus* e está, predominantemente, distribuída pelo Centro e Sul da Europa; e *B. canis rossi*, muito patogénica e encontrada no Sul de África, é veiculada pelo ixodídeo *Haemophysalis leachi* (Uilenberg, et al., 1989; Zahler, Schein & Rinder, 1998; Birkenheuer, 2004; Irwin, 2005; 2009; Macintire, 2005; Figueiredo, 2007).

Em regiões endémicas a seroprevalência de anticorpos anti-*Babesia* pode variar entre 3,8% a 80% (Irwin, 2005). Existe uma variação sazonal na ocorrência da infecção por *Babesia canis*, verificando-se um pico nos meses mais quentes do ano (Lobetti, 2000).

Na Europa a doença é prevalente predominantemente na região do Mediterrâneo (Rochette, 2003; Figueiredo, 2007). Um estudo realizado por Cardoso e colaboradores (2008), menciona

a existência de infecção natural por *Babesia canis canis* e *Babesia canis vogeli* em cães do nordeste de Portugal.

2.2. CICLO DE VIDA e PATOGENIA

A *Babesia canis* afecta canídeos de todas as idades, no entanto os animais jovens são mais susceptíveis à infecção (Lobetti, 2000; Schoeman, 2009).

Os protozoários do género *Babesia* são transmitidos ao hospedeiro vertebrado através da picada de um ixodídeo infectado (Irwin, 2005). Este veícula, juntamente com a sua saliva, esporozoítos infectantes para a circulação sanguínea do hospedeiro. No interior do hospedeiro, os esporozoítos ligam-se à membrana eritrocitária e invadem, posteriormente, a célula por endocitose, diferenciando-se em merozoítos. Estes multiplicam-se activamente por divisão binária e lesam a célula hospedeira resultando na ruptura dos eritrócitos infectados, libertando assim os merozoítos que se disseminam e invadem outros eritrócitos (Irwin, 2005, 2009). Para que a transmissão da infecção por *Babesia canis* seja eficaz, o ixodídeo tem que se alimentar durante, pelo menos, dois a três dias no hospedeiro (Boozer & Macintire, 2003; Macintire, 2005; Taboada & Lobetti, 2006).

Os ixodídeos infectam-se com merozoítos quando se alimentam dum hospedeiro vertebrado infectado, numa fase de parasitémia. Dentro do vector, ocorrem vários ciclos de esquizogonia nas células epiteliais do intestino, glândulas salivares, ovários e oócitos, garantindo assim a transmissão transovárica dos parasitas (Irwin, 2005).

Para além da transmissão através do vector, estão descritos outros modos de transmissão que incluem a via transplacentária (Irwin, 2005), transfusões de sangue contaminado (Lobetti, 2000; Irwin, 2005) e transmissão directa por contacto sanguíneo, através de lutas ou mordeduras (Irwin, 2005, 2009; Macintire, 2005).

O período de incubação da doença provocada por *Babesia canis*, é de 10 a 21 dias (Lobetti, 2000, 2005; Boozer & Macintire, 2003; Nelson & Couto, 2003; Schoemna, 2009). A patogenicidade da infecção depende da sub-espécie envolvida e de factores relacionados com o hospedeiro, tais como a idade, raça, competência imunológica e presença de doenças concomitantes (Hausschild, Shayan & Schein, 1995; Shaw, Day, Birtles & Breitschwerdt, 2001; Birkenheuer, 2004; Taboada & Lobetti, 2006; Irwin, 2009; Schoeman, 2009).

A resposta imunológica e a hipoxia têm um papel fundamental na patogénese da babesiose. A invasão e a replicação intra-eritrocitária dos protozoários conduzem à destruição eritrocitária. Esta destruição tem etiologia multi-factorial e inclui a lesão directa na membrana eritrocitária

provocada pelo parasita (Homer, et al., 2000; Birkenheuer, 2004), a remoção dos eritrócitos parasitados e lesados pelo baço, a activação do complemento, e a presença de anticorpos anti-eritrócitos (Homer et al., 2000; Birkenheuer, 2004) que provocam uma anemia imunomediada secundária (Homer et al., 2000; Birkenheuer, 2004). A anemia é responsável pela maioria dos sinais clínicos manifestados pelos animais infectados. A hipoxia anémica resultante da crise hemolítica pode levar ao aumento do metabolismo anaeróbio, à excessiva produção de ácido láctico, acidose metabólica e dissociação da curva de hemoglobina para a direita, aumento da fracção da carboxihemoglobina e redução da oxigenação tecidual (Lobetti, 2005).

A hiperplasia do sistema mononuclear fagocítico do baço e a dilatação da sua microvasculatura interna em resposta à libertação de mediadores inflamatórios provoca esplenomegália (Lobetti, 2000).

A libertação de substância pirógenas após lise dos eritrócitos, destruição parasitária e activação de mediadores inflamatórios provoca um quadro febril (Lobetti, 2000; 2005).

2.3. QUADRO CLÍNICO e LESIONAL

O quadro clínico da babesiose canina pode ser classificado, de acordo com a sintomatologia manifestada e comprometimento sistémico do animal, na forma complicada e não complicada (Lobetti, 2004; Irwin, 2005; Taboada & Lobetti, 2006), esta última pode ainda ser subdividida em hiperaguda, aguda, crónica ou subclínica (Taboada & Lobetti, 2006; Gopegui, et al., 2007; Shoeman, 2009).

A doença aguda é a manifestação mais comum da babesiose, enquanto a forma hiperaguda, mais rara (Taboada & Lobetti, 2006; Figueiredo, 2007), é caracterizada por colapso agudo devido a choque hipotensivo, hipoxia, lesão tecidual extensa, alterações neurológicas e síndrome de insuficiência respiratória aguda (Irwin, 2005).

A forma aguda da babesiose canina, resultante da hipoxia tecidual e da libertação massiva de mediadores inflamatórios (Taboada & Lobetti, 2006; Schoeman, 2009), é caracterizada por febre, letargia, anorexia, depressão, vômito, palidez das membranas mucosas, esplenomegália, linfadenopatia e, ocasionalmente, icterícia e hematúria (Hauschild, et al., 1995; Boozer & Macintire, 2003; Lobetti, 2004; Irwin, 2005; Schoeman, 2009).

A forma crónica está associada, principalmente, a sinais clínicos não específicos (Irwin, 2005) como febre intermitente, anorexia, letargia, perda progressiva da condição corporal (Taboada & Merchant, 1997). Em zonas endémicas, é frequente a forma subclínica de infecção, com parasitémias ligeiras e intermitentes. Os animais são portadores permanentes do agente, que

fica sequestrado nos capilares hepáticos e esplênicos, e situações de *stress*, tratamentos imunossupressores ou ocorrência de doenças concomitantes podem induzir a libertação da *Babesia* para a circulação (Irwin, 2005).

A forma complicada de babesiose refere-se a manifestações clínicas que não são facilmente explicáveis só pelo processo hemolítico. Complicações possíveis incluem insuficiência renal aguda, sinais neurológicos (convulsões, coma, esturpor), coagulopatias, icterícia e hepatopatia, anemia hemolítica imunomediada, síndrome de stress respiratório agudo, hemoconcentração, hipotensão, envolvimento cardíaco e pancreatite (Lobetti, 2004; Keller et al., 2005; Jacobson, 2006; Schoeman, 2009; Matijatko, et al., 2010). A sobreposição de complicações pode também ocorrer (Bourdeiseau, 2006; Taboada & Lobetti, 2006; Gopegui, et al., 2007). De acordo com Irwin (2005), a mortalidade na babesiose complicada pode exceder os 80%.

2.4. PATOLOGIA CLÍNICA

As principais alterações hematológicas encontradas nos animais infectados por *Babesia* são anemia, geralmente normocítica e normocrômica, e trombocitopénia (Lobetti, 2000; Taboada & Lobetti, 2006; Zygmier, Gójska, Rapacka, Jaros & Wedrychowicz, 2007a). A trombocitopénia que se verifica na maioria dos animais infectados deve-se, provavelmente, à destruição plaquetária imunomediada, sequestro de plaquetas no baço (Taboada & Lobetti, 2006; Zygmier, et al., 2007a).

As anomalias leucocitárias são inconsistentes e pouco específicas nesta doença, e podem incluir leucocitose, neutrofilia, neutropénia, linfocitose e eosinofilia (Taboada & Lobetti, 2006).

As alterações nos parâmetros de bioquímica sanguínea são resultado da gravidade da doença e da hipoxia (Lobetti, 2004; Zygmier & Wedrychowicz, 2009). As mais frequentes são alterações nos parâmetros hepáticos, com aumento da ALT, AST e FAS, alterações nos parâmetros renais, com aumento da ureia e creatinina, e hipoglicémia (Irwin, 2005; Jacobson, 2006; Taboada & Lobetti, 2006). Na electroforese de proteínas observa-se uma diminuição nos níveis de proteínas séricas, albumina, relação albumina/globulinas e da alfa-globulina em casos graves (Lobetti, 2000; Taboada & Lobetti, 2006).

2.5. DIAGNÓSTICO

A babesiose canina, tal como a generalidade das doenças transmitidas por ixodídeos, é caracterizada por um quadro clínico inespecífico e com uma larga variedade de apresentações clínicas. Deste modo, o seu diagnóstico clínico pode ser um desafio. A história e exame físico são essenciais, no entanto é necessário o recurso a meios complementares para chegar ao diagnóstico definitivo.

Para o diagnóstico específico e definitivo é necessária a identificação do agente etiológico ou a identificação de merozoítos através de esfregaços sanguíneos corados pelos métodos de Giemsa ou Wrigth (Nelson & Couto, 20003; Irwin, 2009), pela amplificação de ADN extraído de sangue ou tecidos infectados ou pela detecção de anticorpos específicos, através de métodos serológicos (Taboada & Lobetti, 2006).

Nos métodos de diagnóstico directo, a microscopia é o mais utilizado devido ao seu baixo custo, facilidade e simplicidade de execução (Dantas-Torres & Figueiredo, 2006; Irwin, 2009). Possui alta especificidade mas baixa sensibilidade, sendo útil em infecções agudas com elevada parasitémia. Nos casos crónicos ou subclínicos, em que a parasitémia é baixa e intermitente, pode não ser possível a detecção das formas parasitárias por microscopia (Boozer & Macintire, 2003; Dantas-Torres & Figueiredo, 2006; Irwin, 2009; Schoeman, 2009).

As técnicas de diagnóstico indirecto, como a serologia, nomeadamente a IFI, são úteis para a identificação de portadores assintomáticos e para o diagnóstico de infecções crónicas ou subclínicas, nas quais o baixo, ou nulo, grau de parasitémia, pode não ser detectável nos esfregaços de sangue periférico (Dantas-Torres & Figueiredo, 2006). A IFI é considerada muito sensível mas moderadamente específica, mas não diferencia infecção aguda de exposição clínica ao agente e devido à ocorrência de reacções cruzadas serológicas entre as várias espécies de *Babesia* sp. (Macintire, 2005; Taboada & Lobetti, 2006). Cães seropositivos a *Babesia* sp. não devem ser utilizados como dadores de sangue (Macintire, 2005).

O desenvolvimento da biologia molecular, particularmente da PCR, veio revolucionar o diagnóstico de babesiose. A grande vantagem deste método é a sua maior sensibilidade na detecção de ADN protozoário no sangue periférico. É o único método que permite identificar a espécie ou subespécie infectante e é mais sensível na detecção de portadores subclínicos (Macintire, 2005).

2.6. TRATAMENTO

Os objectivos principais do tratamento da babesiose canina são o controlo da anemia, que pode ameaçar a sobrevivência do animal, e a eliminação do parasita (Lobetti, 2000; Schoeman, 2009).

O dipropionato de imidocarb e o aceturato de diminazeno são os fármacos mais eficazes no tratamento contra *Babesia canis* (Taboada & Lobetti, 2006; Schoeman, 2009).

O dipropionato de imidocarb tem efeitos directos no núcleo e citoplasma do parasita (Boozer & Macintire, 2003), e recomenda-se a administração na dose de 5-6,5 mg/kg, IM ou SC, em duas tomas com 14 dias de intervalo ou 7,5 mg/kg, IM ou SC, em toma única (Taboada & Lobetti, 2006; Schoeman, 2009). Tem efeitos directos no núcleo e no citoplasma do parasita. Como possíveis efeitos adversos estão descritos dor no local da injeção (Bourdeiseau, 2006), ptialismo, vômito, diarreia, depressão, tremores musculares, taquicardia, dispneia e diarreia (Boozer & Macintire, 2003). A atropina (dose 0,05 mg/kg, SC), administrada 30 minutos antes, minimiza estas reacções adversas (Boozer & Macintire, 2003).

O aceturato de diminazeno é administrado de uma única vez na dose de 3,5 mg/kg, IM (Lobetti, 2000, 2004; Boozer & Macintire, 2003). Pensa-se que o seu mecanismo de acção se baseie na interferência da glicólise aeróbia e inibição da síntese de ADN do parasita (Boozer & Macintire, 2003). Dor no local da injeção, vômito, hipotensão, efeitos parassimpaticomiméticos e sinais neurológicos (estupor, depressão, ataxia, nistagmus) (Lobetti, 2000; Boozer & Macintire, 2003) estão descritos como possíveis efeitos secundários.

Os cães tratados com estes fármacos, geralmente, apresentam uma melhoria do estado clínico 24 horas após o tratamento (Taboada & Lobetti, 2006).

3. EHRLICHIA CANIS

3.1. ETIOLOGIA e EPIDEMIOLOGIA

A erliquiose monocítica canina (EMC) é uma doença parasitária, transmitida por ixodídeos, provocada por uma bactéria pleomórfica Gram negativa (Ettinger & Feldman, 2005), pertencente à espécie *Ehrlichia canis*, género *Ehrlichia*, família *Anaplasmataceae* e ordem *Rickettsiales* (Breitschwerdt, 1997; Warner, 2008). É um parasita intracelular obrigatório do monócitos e macrófagos (Aguirre, et al., 2004; Gal, Loeb, Yisaschar-Mekuzas & Baneth, 2007; Alexandre, et al., 2008), onde se replica por divisão binária e forma grandes corpos de inclusão denominados de mórulas (Ettinger & Feldman, 2005). É transmitida pelo ixodídeo

vector, *Rhipicephalus sanguineus*, vulgarmente conhecido como a carraça castanha do cão (Harrus, Warner, Jongejan & Cornelissen, 1999; Warner & Harrus, 2000; Skotarczak, 2003; Aguirre, et al., 2004; Ettinger & Feldman, 2005; Neer & Harrus, 2006; Gal, et al., 2007; Alexandre, et al., 2008; Warner, 2008) e tem como hospedeiros vertebrados membros da família *Canidae* (Skotarczak, 2003; Neer & Harrus, 2006; Figueiredo, 2007; Warner, 2008). Este vector tem grande importância epidemiológica por ser cosmopolita e ser o principal reservatório da doença.

Ehrlichia canis tem uma distribuição mundial (Ásia, África, Europa e América) (Harrus, et al., 1999; Ettinger & Feldman, 2005) e tem especial prevalência nas regiões tropicais e subtropicais (Skotarczak, 2003; Breitschwerdt, 2007a). Estudos serológicos realizados na Europa indicam que as seroprevalências mais elevadas são encontradas nos países da Bacia do Mediterrâneo. Em Portugal, Bacellar e colaboradores (1995) registaram uma seroprevalência de 54,5%, em canídeos errantes da região de Setúbal enquanto que Alexandre (2005) refere uma seroprevalência de 5,25%, em canídeos não errantes da região do Algarve.

A maioria dos casos de erliquiose monocítica canina ocorre durante os meses quentes do ano (Neer & Harrus, 2006), quando a densidade populacional de vectores é mais elevada (Warner & Harrus, 2000; Neer & Harrus, 2006).

3.2. CICLO DE VIDA e PATOGENIA

Rhipicephalus sanguineus contamina-se quando se alimenta do sangue de um cão portador de *Ehrlichia canis*. A *Ehrlichia* multiplica-se nos hemócitos e glândulas salivares do ixodídeo (Figueiredo, 2007). Existe transmissão transtadial mas não ocorre transmissão transovárica deste agente (Alexandre, 2005). Durante a refeição sanguínea, o ixodídeo inocula, juntamente com as secreções salivares, as bactérias no hospedeiro vertebrado (Neer & Harrus, 2006). Durante o período de incubação, que tem uma duração de 8 a 20 dias (Rikihisa, 1991; Harrus, et al., 1999; Warner & Harrus, 2000; Neer & Harrus, 2006; Figueiredo, 2007; Warner, 2008), as bactérias multiplicam-se activamente por divisão binária no interior dos macrófagos do sistema mononuclear fagocitário, disseminando-se por diferentes órgãos e tecidos (Warner & Harrus, 2000; Neer & Harrus, 2006; Warner, 2008).

O curso da infecção pode seguir três fases, dependendo da competência imunológica do hospedeiro, da idade, raça e da presença de infecções concomitantes (Nelson & Couto, 2003; Figueiredo, 2007): aguda, subclínica e crónica (Rikihisa, 1991; Harrus, et al., 1999; Warner & Harrus, 2000; Skotarczak, 2003; Nelson & Couto, 2003; Neer & Harrus, 2006; Breitschwerdt,

2007a). Na fase aguda, que se inicia uma a três semanas após a infecção e dura entre de duas a quatro semanas (Nelson & Couto, 2003; Skotarczak, 2003), o microrganismo multiplica-se nas células mononucleares e linfócitos e dissemina-se para as células do sistema retículo endotelial do fígado, baço e linfonodos, resultando em hiperplasia linforreticular e organomegália, como hepatomegália, esplenomegália e linfadenomegália. A fase aguda da doença é mais frequentemente reconhecida na Primavera e no Verão quando o vector é mais activo (Nelson & Couto, 2003). Na fase subclínica, a *Ehrlichia canis* persiste intracelularmente na maioria dos hospedeiros, após aparente recuperação da fase aguda. Esta fase pode durar meses a anos, e o animal pode não demonstrar sintomatologia evidente ou apenas ligeiras alterações nos parâmetros hematológicos (Skotarczak, 2003). Os animais nesta fase podem permanecer portadores permanentes da doença, recuperar espontaneamente ou progredir para a fase crónica da doença (Shipov, Klement, Reuveni-Tager, Warner & Harrus, 2008). A perda da competência imunológica do hospedeiro e a não eliminação do agente leva a que a doença evolua para a fase crónica. Muitas das alterações clínicas e patológicas desenvolvidas durante a fase crónica devem-se a reacções imunes dirigidas contra o parasita intracelular (Nelson & Couto, 2003). Nesta fase, a característica hipoplasia medular resulta em anemia aplástica, monocitose, linfocitose e leucopénia (Nelson & Couto, 2003).

Não está descrita predisposição para a infecção relacionada com a idade ou com o sexo, no entanto, os cães de raça Pastor Alemão parecem ser mais susceptíveis (Harrus, et al., 1999; Warner & Harrus, 2006; Ettinger & Feldman, 2005; Neer & Harrus, 2006), com um quadro clínico mais grave e de pior prognóstico. A susceptibilidade à infecção está relacionada com a capacidade de desencadear uma resposta imunitária adequada e eficaz (Neer & Harrus, 2006). A resposta do tipo celular que confere protecção contra a infecção por *Ehrlichia canis* encontra-se deprimida na raça Pastor Alemão (Warner & Harrus, 2000; Neer & Harrus, 2006) e, em contrapartida, a resposta humoral com excessiva produção de anticorpos e presença de complexos imunes está exacerbada (Harrus, et al., 2001).

3.3. QUADRO CLÍNICO e LESIONAL

A erliquiose monocítica canina pode manifestar-se numa grande variedade de sinais clínicos (Warner & Harrus, 2000). Esta variedade pode dever-se a factores como a raça e estado imunitário do hospedeiro, a presença de infecções concomitantes e a patogenicidade da espécie de *Ehrlichia* infectante (Warner & Harrus, 2000). É uma doença multi-sistémica (Neer, Breitschwerdt, Greene & Lappin, 2002; Neer & Harrus, 2006) e a sua apresentação

clínica clássica caracteriza-se por letargia, depressão, ligeira perda de peso e anorexia, associada ou não a tendências hemorrágicas (Harrus, et al., 1999; Neer, et al., 2002; Neer & Harrus, 2006).

Na fase aguda da doença as carraças são frequentemente referidas pelos proprietário ou encontradas no hospedeiro (Warner & Harrus, 2000; Nelson & Couto, 2003). Os sinais clínicos, na maioria dos casos, são inespecíficos e incluem anorexia, febre, prostração, ligeira perda de peso, esplenomegália e linfadenomegália (Warner & Harrus, 2000; Nelson & Couto, 2003; Skotarczak, 2003; Ettinger & Feldman, 2005). Os animais podem apresentar alterações hemorrágicas, principalmente petéquias e equimoses ao nível da pele e membranas mucosas e, ocasionalmente, epistáxis (Warner & Harrus, 2000). A presença de vômito, claudicação, ataxia, dispneia, e corrimento ocular mucoso ou purulento são também referidos (Warner & Harrus, 2000). Podem ocorrer sinais oculares como uveíte anterior, opacidade da córnea, hifema, vasos retiniais tortuosos, hemorragias sub-retinais, descolamento da retina e cegueira (Harrus, et al., 1999; Warner & Harrus, 2000; Nelson & Couto, 2003; Neer & Harrus, 2006). Com a terapêutica adequada, a maioria dos cães infectados recupera da fase aguda da doença, no entanto cães não tratados ou com terapêuticas ineficazes entram na fase subclínica da doença (Neer & Harrus, 2006). Nesta fase os animais parecem clinicamente saudáveis, com normalização do peso e da temperatura, contudo permanecem infectados podendo ser portadores assintomáticos da doença durante anos (Neer & Harrus, 2006).

Os sinais clínicos mais comuns da fase crónica são fraqueza, letargia, prostração, anorexia, perda de peso progressiva, linfadenomegália, membranas mucosas pálidas, febre, edemas periféricos, principalmente a nível do escroto e membros posteriores, petéquias e equimoses na pele e membranas mucosas, e epistáxis (Warner & Harrus, 2000; Skotarczak, 2003; Ettinger & Feldman, 2005). Nesta fase os cães geralmente morrem de infecções secundárias e hemorragias incontroláveis (Neer & Harrus, 2006).

Os sinais neurológicos, que podem ocorrer tanto na fase aguda como na fase crónica da doença, resultam, principalmente, de meningite devido ao processo inflamatório e/ou hemorragias (Neer & Harrus, 2006). Estão também referidas convulsões, estupor, ataxia com disfunção dos neurónios motores superior e inferior, disfunção vestibular, anisocoria, disfunção cerebelar, e hiperestesia, local ou generalizada (Ettinger & Feldman, 2005; Neer & Harrus, 2006).

3.4. PATOLOGIA CLÍNICA

As alterações hematológicas mais frequentemente encontradas em infecções por *Ehrlichia canis* são a trombocitopenia (Neer & Harrus, 2006), a anemia normocítica, normocrômica, não regenerativa (Neer, et al., 2002; Nelson & Couto, 2003) e a leucopenia (Neer & Harrus, 2006). As alterações bioquímicas incluem hiperproteinemia, hiperglobulinemia, hipoalbuminemia e elevação de actividade das enzimas hepáticas, ALT e FAS (Warner & Harrus, 2000; Neer & Harrus, 2006).

A hiperproteinemia resulta do aumento dos níveis das globulinas, sendo a hiperglobulinemia geralmente policlonal (Harrus, et al., 1999). No entanto, a gamapatia monoclonal pode ocorrer (Nelson & Couto, 2003; Neer & Harrus, 2006) embora a policlonal seja mais comum (Neer, et al., 2002).

A pancitopenia é característica da fase crónica e resulta da hipoplasia de todas as células precursoras da medula óssea (Warner & Harrus, 2000; Neer, et al., 2002; Neer & Harrus, 2006).

A Tabela 2 mostra as alterações laboratoriais mais frequentemente observadas nas diferentes fases clínicas da doença.

Fase	Aguda	Subclínica	Crónica
Alterações	Trombocitopenia;	Trombocitopenia;	Trombocitopenia;
	Leucocitose;	Neutropenia;	Anemia não regenerativa;
	Neutrofilia;	Linfocitose;	Hiperglobulinemia;
	Monocitose;	Monocitose;	Hipoplasia da medula óssea;
	Anemia ligeira	Hiperglobulinemia;	Hipoalbuminemia; Elevação da ALT e FAS.

Tabela 2 – Principais alterações laboratoriais nas diferentes fases clínicas (Adaptado de Nelson & Couto, 2003)

3.5. DIAGNÓSTICO

O diagnóstico de erliquiose monocítica canina deve ser baseado na história clínica, na apresentação e sintomatologia clínicas, alterações sanguíneas e bioquímicas e confirmada por testes laboratoriais de diagnóstico (Warner & Harrus, 2000). Quanto mais precoce o diagnóstico da doença, melhor o prognóstico dos animais infectados (Warner & Harrus, 2000).

O diagnóstico normalmente é baseado na detecção e titulação de anticorpos anti-*Ehrlichia* utilizando a técnica IFI (Neer, et al., 2002; Neer & Harrus, 2006). A presença de títulos de

anticorpos superiores a 1:80 são considerados como evidência de infecção ou exposição ao agente (Warner & Harrus, 2000; Neer & Harrus, 2006). A demonstração de seroconversão, isto é, o aumento ou diminuição em quatro vezes do título de anticorpos original de sangue recolhido com quinze dias de intervalo, confirma o diagnóstico. É um método serológico com elevadas sensibilidade e especificidade, no entanto, a sua principal desvantagem consiste na possibilidade de ocorrência de reacções cruzadas nas regiões endémicas, onde outras espécies de *Ehrlichia* spp. sejam prevalentes (Warner & Harrus, 2000).

O diagnóstico de erliquiose monocítica canina pode ainda ser realizado através da visualização de mórulas no citoplasma dos monócitos em esfregaços sanguíneos ou em punções aspirativas de linfonodos, fígado e medula óssea (Ettinger & Feldman, 2005; Neer & Harrus, 2006). No entanto, esta técnica é pouco sensível, e é apenas útil na fase aguda da doença (Warner & Harrus, 2000). A não observação do parasita não exclui a possibilidade de infecção por *Ehrlichia canis* (Sales, Braga, Silva, Muraro & Siqueira, 2007).

A detecção de ADN do agente por PCR é uma técnica que possui elevadas sensibilidade e especificidade e que permite a detecção da doença na fase aguda antes da seroconversão e a identificação específica do agente causal. A pesquisa por PCR pode ser realizada em sangue, líquido sinovial e cefalorraquidiano, e humor aquoso (Nelson & Couto, 2003). As suas principais desvantagens relacionam-se com o facto de ser uma técnica dispendiosa e necessitar de equipamento e técnicos especializados.

A ocorrência de infecções concomitantes pode dificultar o diagnóstico, pelo que é aconselhada a combinação de várias técnicas (Harrus et al., 2005).

3.6. TRATAMENTO

O objectivo do tratamento é a cura clínica e parasitológica dos animais e evitar o estado de portador assintomático, que torna os animais potenciais transmissores da doença.

Existem vários fármacos eficazes contra a *Ehrlichia canis* como a tetraciclina, oxitetraciclina, doxiciclina associada ou não a dipropionato de imidocarb.

O antibiótico de eleição é a doxiciclina (Ettinger & Feldman, 2005), um antibiótico bacteriostático da família das tetraciclinas que actua em todas as fases da erliquiose monocítica canina (Warner & Harrus, 2000), e atinge uma elevada concentração sanguínea e tecidual, penetrando rapidamente na maioria das células (Sousa, Higa & Gerardi, 2004). Deve

ser utilizada na dose de 10 mg/kg/SID (Warner & Harrus, 2000; Ettinger & Feldman, 2005; Ramsey, 2008), por via oral durante 28 dias (Neer, et al., 2002).

A utilização da doxiciclina em associação com dipropionato de imidocarb (6,6 mg/kg, IM ou SC, em toma única e repetida passados 15 dias (Ramsey, 2008) para o tratamento desta doença, não altera a resposta clínica do animal quando comparada com a utilização da doxiciclina isolada, excepto em situações de co-infecção com *Babesia canis* (Sousa, et al., 2004).

Outros agentes terapêuticos (Warner & Harrus, 2000) utilizados no tratamento da erliquiose monocítica canina estão resumidos na Tabela 3.

Fármaco	Dose	Via	Frequência	Duração
Doxiciclina	10 mg/kg	PO	SID	28 dias
Minociclina	5-10 mg/kg	PO	BID	21 a 28 dias
Tetraciclina	22 mg/kg	PO	TID	21 a 28 dias
Oxitetraciclina	10-20 mg/kg	PO	TID	21 a 28 dias
Cloranfenicol	25-50 mg/Kg	PO	TID	28 dias

Tabela 3 – Fármacos utilizados no tratamento da erliquiose monocítica canina. (Adaptado de Warner & Harrus, 2000)

A resposta à terapêutica é avaliada através da melhoria clínica do animal, e que geralmente se manifesta entre as 24 e as 48 horas após o início do tratamento (Breitschwerdt, 1997; Neer, et al., 2002).

4. *RICKETTSIA CONORII*

4.1. ETIOLOGIA e EPIDEMIOLOGIA

A *Rickettsia conorii* é uma bactéria Gram negativa de vida intracelular obrigatória (Galvão, et al., 2005; Fang, et al., 2007), com dimensões de 0,3 a 0,5 por 0,9 a 1,6 µm (Raoult & Parola, 2007), e possui tropismo para as células endoteliais (Fang, et al., 2007). Pertence ao género *Rickettsia*, ordem *Rickettsiales* (Galvão, et al., 2005; Parola, Paddock & Raoult, 2005; Raoult & Parola, 2007), e provoca doença em canídeos domésticos, vulgarmente conhecida como *Mediterranean Spotted Fever* ou febre maculosa mediterrânea (Solano-Gallego, et al., 2006a).

O género *Rickettsia* divide-se em dois grupos: o grupo do tifo (que inclui, por exemplo, *R. typhi*) e o grupo das febres exantemáticas, onde está incluída a *Rickettsia conorii*, entre outras (Sousa, Nóbrega, Bacelar & Torgal, 2003; Galvão, et al., 2005).

O vector e reservatório do agente é o ixodídeo *Rhipicephalus sanguineus* (Mumcuoglu, Keysary & Gilead, 2002; Sousa, Nóbrega, Bacellar & Torgal, 2003; World Health Organization [WHO], 2004; Solano-Gallego, et al., 2006a; Harrus, et al., 2007), a carraça castanha do cão (Breitschwerdt, 2007b; Fang, et al., 2007; Raoult & Parola, 2007).

A infecção por esta espécie é endémica em várias partes de África, Ásia e países da Bacia do Mediterrâneo (WHO, 2004; Parola, Paddock & Raoult, 2005; Harrus, et al., 2007; Raoult & Pasola, 2007). Em Portugal, estudos serológicos para *Rickettsia conorii* revelaram seroprevalências de 38,5%, numa população de 400 canídeos na região do Algarve (Alexandre, 2005), e 85,6% numa população de 104 canídeos residentes no canil municipal de Setúbal (Bacellar, Dawson, Silveira & Filipe, 1995).

4.2. CICLO DE VIDA e PATOGENIA

O ixodídeo, *Rhipicephalus sanguineus*, infecta-se com *Rickettsia conorii* ao ingerir sangue contaminado de um hospedeiro, em fase de riquetsiémia (Nicholson, Aleen, McQuiston, Breitschwerdt & Little, 2010). Após a ingestão, as riquetsias replicam-se no tracto digestivo do vector, e disseminam-se e multiplicam-se em outros tecidos, como os ovários e as glândulas salivares (Duarte, 2008). A *Rickettsia conorii* é transmitida ao cão através da picada do ixodídeo infectado, durante a sua refeição sanguínea (Breitschwerdt, 2007b). O tempo necessário de fixação do ixodídeo para que ocorra transmissão do agente ao hospedeiro, varia entre seis a vinte horas (Sousa, et al., 2003; Breitschwerdt, 2007b). Após a inoculação, a bactéria é disseminada pelo sistema circulatório, invade e replica-se nas células endoteliais de pequenos vasos e capilares (Parola, et al., 2005; Raoult & Parola, 2007), provocando a sua lesão directa (Greene & Breitschwerdt, 2006). Esta lesão endotelial resulta em inflamação e necrose vascular, e subsequentemente, no aumento da permeabilidade vascular (Ettinger & Feldaman, 2005), que provoca a extravasão de fluido e sangue para o espaço extravascular e contribui para a formação de edemas, hemorragia, hipotensão e choque (Breitschwerdt, 2007b). O edema do sistema nervoso central pode contribuir para o desenvolvimento dos sinais neurológicos, rápida deterioração clínica e morte (Breitschwerdt, 2007b). Nos animais diagnosticados ou tratados tardiamente podem surgir complicações, como sinais de doença ocular (hifema) ou neurológica, que incluem hiperestesia, convulsões e alterações vestibulares (Greene & Breitschwerdt, 2006).

Cães de raça pura parecem ser mais susceptíveis à infecção por riquetsias do que cães cruzados ou de raça indeterminada, tendo os cães de Raça Pastor Alemão uma elevada

prevalência de doença (Greene & Breitschwerdt, 2006). Foi referido que os cães da raça *English Springer Spaniel* com deficiência hereditária em fosfofrutoquinase e os cães com instituição terapêutica tardia tendem a desenvolver um quadro clínico mais grave (Greene & Breitschwerdt, 2006).

4.3. QUADRO CLÍNICO e LESIONAL

As alterações clínicas e laboratoriais são semelhantes nas diferentes espécies de riquetsias existentes, embora a gravidade da doença possa variar. Todas as espécies de *Rickettsia* pertencentes ao grupo exantemático são caracterizadas por provocar doença aguda de progressão rápida, geralmente acompanhada de febre e trombocitopenia (Breitschwerdt, 2007b). Estas riquetsias infectam as células endoteliais e os sinais clínicos resultam de uma vasculite sistêmica (Kidd, 2006). Segundo Greene & Breitschwerdt (2006) a infecção por *Rickettsia conorii* provoca uma riquetsiemia transitória e o curso da doença é subclínico. O aparecimento brusco de febre alta (Greene & Breitschwerdt, 2006; Solano-Gallego, et al., 2006a; Harrus, et al., 2007) é um dos sinais mais consistentemente observados, podendo desenvolver-se alguns dias após a exposição ao vector.

Existem poucos estudos publicados que associam infecção natural por *Rickettsia conorii* a quadros clínicos em canídeos (Kidd, 2006; Solano-Gallego, Lull, Osso, Hegarty & Breitschwerdt, 2006). Os únicos sinais descritos em canídeos experimentalmente infectados com *Rickettsia conorii* foram dor, eritema e edema no local de inoculação e linfadenopatia regional (Kelly, et al., 1992). Solano-Gallego e colaboradores (2006) descrevem infecção clínica natural por *Rickettsia conorii*, comprovada por PCR, sequenciação de ADN e seroconversão, em 3 cães machos, de raça *Yorkshire Terrier*, não relacionados entre si, com idade média de 4,3 anos e com história de exposição prévia a carraças. Os casos ocorreram no período compreendido entre Maio e Setembro de 2005 e os sinais clínicos observados neste estudo foram febre (40.1-41°C) (n=3), anorexia (n=3), letargia (n=3), linfadenomagália localizada (n=2), taquicardia (n=1), cifose e locomoção rígida (n=1), claudicação intermitente com dor articular (n=1), dor abdominal (n=1), desidratação (n=1), ptialismo (n=1), conjuntivite (n=1) e blefarite (n=1).

4.4. PATOLOGIA CLÍNICA

No mesmo estudo referido anteriormente, realizado por Solano-Gallego e colaboradores (2006a), as alterações hematológicas e bioquímicas descritas na infecção clínica natural por *Rickettsia conorii* (Solano-Gallego et al., 2006), incluíram anemia microcítica e hipercrômica (n=1), trombocitopénia (n=2), neutrofilia (n=2), hipoproteinémia (n=2) e hipoalbuminémia (n=2), aumento das α_2 (n=2) e β globulinas (n=1), aumento da ALT (n=1) e aumento da ureia (n=1).

4.5. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O diagnóstico definitivo deve basear-se na combinação entre a história clínica, sinais clínicos, alterações laboratoriais e técnicas laboratoriais. Existem vários métodos complementares de diagnóstico, desde visualização directa do agente etiológico em esfregaços sanguíneos, serologia a técnicas moleculares, como a amplificação de ADN por PCR (Scola & Raoult, 1997; Alexandre, 2005).

4.6. TRATAMENTO

Os protocolos terapêuticos para a *Rickettsia conorii* são semelhantes aos protocolos terapêuticos instituídos para a *Ehrlichia canis*, uma vez que pertencem à mesma família e a sensibilidade farmacológica é idêntica. A tetraciclina (22 mg/kg, TID, durante 14 dias) ou a doxiciclina (5 mg/kg, BID, durante 14 dias) são os fármacos de eleição para o tratamento desta riquetsiose (Galvão, et al., 2005).

5. INFECÇÕES CONCOMITANTES

As doenças transmitidas por vectores constituem um importante grupo de doenças que afectam os animais mundialmente (Trotz-William & Trees, 2003; Dantas-Torres, 2008). São doenças causadas por diversos agentes etiológicos e transmitidas por diferentes vectores artrópodes (Dantas-Torres, 2008). O mesmo artrópode pode ser vector de mais do que um agente patogénico. A infecção simultânea com mais de um agente etiológico tem importantes implicações diagnósticas, terapêuticas e prognósticas para o hospedeiro infectado (Breitschwerdt, 2007a). A patogénese das doenças concomitantes não é totalmente compreendida e envolve vários mecanismos relacionados com a transmissão, a invasão do hospedeiro e da célula, a resposta imunitária e a disseminação dos agentes patogénicos

(Graham, Cattadori, Lloyd-Smith, Ferreri & Bjornstad, 2007). As consequências fisiopatológicas da co-infecção com diferentes agentes não foram ainda caracterizadas clínica ou experimentalmente (Breitschwerdt, 2007a). A co-infecção pode explicar, parcialmente, as variações na apresentação clínica, na patogenicidade e na resposta à terapêutica (Shaw, Day, Birtles & Breitschwerdt, 2001).

A prevalência de algumas doenças transmitidas por vectores está a aumentar nos Países Europeus (Beugnet & Marié, 2009), provavelmente devido à maior facilidade de circulação dos agentes patogénicos.

Em áreas endémicas, a infecção de cães, simultânea ou sequencial, por mais do que um agente (Roura, Breitschwerdt, Lloret, Ferrer & Hegarty, 2005; Solano-Gallego, et al., 2006b), depende da presença e abundância de artrópodes vectores (Shaw, et al., 2001; Cardoso, et al., 2010). A geografia, distribuição e densidade populacionais destes vectores são afectadas pelas alterações climáticas, especialmente pelo aquecimento global (Beugnet & Marié, 2009), pluviosidade e humidade. Portugal apresenta condições climáticas, ecológicas e ambientais favoráveis ao desenvolvimento de várias espécies de artrópodes (Silva, Santos, Formosinho & Bacellar, 2006) relacionados com a transmissão de doenças de grande relevância clínica e epidemiológica, como, por exemplo, a babesiose, leishmaniose, erliquiose, rickettsiose, dirofilariose, borreliose, anaplasmose, entre outras (Solano-Gallego, et al., 2006b).

Há autores (Roura, et al., 2005) que relacionam algumas das manifestações clínicas da leishmaniose com a presença de doenças concomitantes provocadas por outros agentes também transmitidos por vectores.

Na literatura consultada apesar de haver muitas referências a co-infecções nos cães com leishmaniose, não se encontraram muitos estudos publicados que o comprovassem, nomeadamente em termos de prevalência de agentes co-infectantes.

O médico veterinário deverá ponderar sempre a possibilidade de co-infecção em cães que habitam em áreas endémicas, principalmente no exterior, sem controlos profiláticos para ectoparasitas, ou em cães que apresentem falhas terapêuticas aos protocolos convencionais ou que apresentem sintomatologia atípica (Roura, 2007)..

Na Tabela 4 descrevem-se alguns estudos realizados em cães com *Leishmania infantum* co-infectados com outro (s) agente (s) patogénico (s).

Autor / ano	País	n	Agente (s) de co-infecção	Prevalência (%) de co-infecção
(Ciaramella et al., 1997)	Itália	21	<i>E. canis</i>	ND
(Cringoli et al., 2002)	Itália	46	<i>Neospora caninum</i>	4,3
(Roura, Breitschwerdt, Lloret, Ferrer, & Hegarty, 2005)	Espanha	2	<i>E. canis</i>	ND
		28	<i>R. rickettsii</i>	ND
		12	<i>Bartonella. vinsonii (berkoffii)</i>	ND
(Mekuzas, et al., 2009)	Itália	34	<i>E. canis</i>	ND
(Cardoso et al., 2010)	Portugal	6	<i>B. canis</i>	16%
		1	<i>B. canis e E. canis</i>	ND

Tabela 4 – Descrição de estudos realizados em cães com leishmaniose e co-infectados com outros agentes

CAPÍTULO II - METODOLOGIA

1. Tipo de Estudo

Este estudo histórico, descritivo e analítico com testagem de hipóteses, tem como objectivo avaliar se os sinais clínicos, as alterações do hemograma e do proteinograma apresentam semelhanças entre canídeos mono-infectados com *Leishmania infantum* e canídeos co-infectados com *Leishmania infantum* e com pelo menos um dos seguintes agentes patogénicos: *Babesia canis*, *Ehrlichia canis* e/ou *Rickettsia conorii*.

2. População

A população em estudo é constituída por uma amostra de 35 animais da espécie canina, de ambos os sexos, que recorreram à consulta na Clínica Veterinária AZEVET, no período compreendido entre Março de 2005 e Julho de 2010. Esta amostra foi dividida em dois grupos, o Grupo A constituído por 17 canídeos mono-infectados com *Leishmania infantum*, e o Grupo B, constituído por 18 canídeos co-infectados com *Leishmania infantum* e/ou *Babesia canis*, *Ehrlichia canis* e/ou *Rickettsia conorii*.

Critérios de inclusão para o Grupo A (Mono-infectados)
<ul style="list-style-type: none">– Diagnóstico de leishmaniose– Registo da história clínica e do exame físico– Registo de hemograma e proteinograma– Sem registo de antecedentes clínicos e serológicos de Leishmaniose
Critérios de inclusão para o Grupo B (Co-infectados)
<ul style="list-style-type: none">– Diagnóstico de leishmaniose e de pelo menos um dos seguintes agentes patogénicos: <i>Babesia canis</i>, <i>Ehrlichia canis</i> e <i>Rickettsia conorii</i>– Registo da história clínica e do exame físico– Registo de hemograma e proteinograma– Sem registo de antecedentes clínicos e serológicos de leishmaniose e/ou um dos seguintes agentes patogénicos: <i>Babesia canis</i>, <i>Ehrlichia canis</i> e <i>Rickettsia conorii</i>
Critérios de exclusão para os dois grupos
<ul style="list-style-type: none">– Serologia duvidosa não confirmada– História clínica insuficiente– Dados laboratoriais insuficientes

Tabela 5 – Critérios de inclusão e de exclusão para os dois grupos

Foram analisados os registos clínicos e laboratoriais dos 35 animais incluídos no estudo, salientando-se o facto de três casos terem sido acompanhados pessoalmente durante o período de estágio curricular.

3. Variáveis

Para a caracterização dos dois grupos em estudo foram definidas as seguintes variáveis:

Variáveis independentes:

Mono-infecção (Grupo A): canídeos com serologia positiva para *Leishmania infantum*

Co-infecção (Grupo B): canídeos com serologia positiva para *Leishmania infantum* e pelo menos um dos seguintes agentes patogénicos: *Babesia canis*, *Ehrlichia canis* e *Rickettsia conorii*;

Variáveis dependentes:

Idade (IDADE), variável numérica; anos;

Peso (PESO), variável numérica; kilograma;

Raça (RAÇA), variável nominal; 1- *Boerbull*; 2- *Boxer*; 3- *Cocker Spaniel*; 4- *Dálmata*; 5- *Dobermann*; 6- *Golden Retriever*; 7- *Husky Siberiano*; 8- *Pastor Alemão*; 9- *Pastor Belga*; 10- *Perdigueiro Português*; 11- *Pit Bull Terrier*; 12- *Rottweiler*; 13- *Samoyedo*; 14- *S.Bernardo*; 15- Indeterminada;

Sexo (SEXO), variável nominal; 1- Feminino; 2- Masculino;

Tipo de infecção (DOENÇA1), variável nominal; 1- Mono-infecção; 2- Co-infecção;

Tipo de infecção e co-infecção (DOENÇA2), variável nominal; 1- *Leishmania infantum*; 2- *Leishmania infantum* + *Babesia canis*; 3- *Leishmania infantum* + *Ehrlichia canis*; 4- *Leishmania infantum* + *Rickettsia conorii*; 5- *Leishmania infantum* + *Babesia canis* + *Ehrlichia canis*; 6- *Leishmania infantum* + *Babesia canis* + *Rickettsia conorii*; 7- *Leishmania infantum* + *Ehrlichia canis* + *Rickettsia conorii*; 8- *Leishmania infantum* + *Babesia canis* + *Ehrlichia canis* + *Rickettsia conorii*;

Sinais dermatológicos (SXDERMAT), variável nominal; 1- Sim; 2- Não;

Perda de peso (PPESO), variável nominal; 1- Sim; 2- Não;

Linfadenomegália (LINFAD), variável nominal; 1- Sim; 2- Não;

Sinais músculo-esqueléticos (SXME), variável nominal; 1- Sim, 2- Não;

Febre (FEBRE), variável nominal; 1- Sim (valor superior a 39,2°C); 2- Não (valor igual ou inferior a 39,2°C) (Nelson & Couto, 2003);

Anemia (ANEMIA), variável nominal; 1- Sim (valor de hemoglobina inferior a 12g/dL); 2- Não (Valor de hemoglobina entre 12-18g/dL);

Plaquetas (PLAQ), variável nominal; 1- Trombocitose (valor superior a $600 \times 10^3/\mu\text{L}$); 2- Normal (valor entre $200 \times 10^3/\mu\text{L}$ e $500 \times 10^3/\mu\text{L}$); 3- Trombocitopénia (valor inferior a $200 \times 10^3/\mu\text{L}$); 4- Trombocitopénia com agregação plaquetária;

Neutrófilos (NEUT), variável nominal; 1- Neutrofilia (valor de neutrófilos superior a 11500/ μL); 2- Normal (valor entre 3000-11500/ μL); 3- Neutropénia (valor inferior a 3000/ μL);

Eosinófilos (EOS), variável nominal; 1- Eosinofilia (valor superior a 1250/ μL); 2- Normal (valor entre 100-1250/ μL); 3- Eosinopénia (valor inferior a 100/ μL);

Proteínas totais (PT), variável nominal; 1- Hiperproteinémia (valor superior a 7,2g/dL); 2- Normal (valor de proteínas entre 5,2-7,2g/dL); 3-Hipoproteinémia (valor inferior a 5,2g/dL);

Albumina (ALB), variável nominal; 1- Hiperalbúminémia (valor superior a 4,31g/dL); 2- Normal (valor entre 2,26-4,31 g/dL); 3-Hipoalbuminémia (valor inferior a 2,26g/dL);

Rácio Albumina/Globulinas (Ratio), variável nominal; 1- Aumentado (valor superior a 1,1%); 2- Normal (valor entre 0,6-1,1%); 3- Diminuído (valor inferior a 0,6%);

Alfa1 globulina (ALFA1), variável nominal; 1- Aumentada (valor superior a 0,75 g/dL); 2- Normal (valor entre 0,32-0,75 g/dL); 3- Diminuído (valor inferior a 0,32 g/dl);

Alfa2 globulina (ALFA2), variável nominal; 1- Aumentada (valor superior a 1,17 g/dL); 2- Normal (valor entre 0,5-1,17 g/dL); 3- Diminuído (valor inferior a 0,5 g/dL);

Beta globulina (BETA), variável nominal; 1- Aumentada (valor superior a 2,0 g/dL); 2- Normal (valor entre 0,93-2,0 g/dL); 3- Diminuído (valor inferior a 0,93 g/dL);

Gama globulina (GAMA), variável nominal; 1-Aumentada (valor superior 1,02 g/dL); 2- Normal (valor entre 0,39-1,02 g/dL); 3- Diminuído (valor inferior a 0,39 g/dL);

Mês de diagnóstico (MÊS), variável nominal; 1- Janeiro; 2- Fevereiro; 3- Março; 4- Abril; 5- Maio; 6- Junho; 7- Julho; 8- Agosto; 9- Setembro; 10- Outubro; 11- Novembro; 12- Dezembro;

Hemoglobina (HEMOGLOBINA), variável numérica, g/dL;

Plaquetas (PLAQUETAS), variável numérica, $\times 10^3/\mu\text{L}$;

Proteínas totais (PROTOTAIS), variável numérica, g/dL:

Temperatura rectal (TEMPRECTAL), variável numérica, graus Célsius;

Co-infecção (DOENÇA3), variável nominal; 2- *Leishmania* + *Babesia*; 3- *Leishmania* + *Ehrlichia*; 4- *Leishmania* + *Rickettsia*; 5- *Leishmania* + *Babesia* + *Ehrlichia*; 6- *Leishmania* + *Babesia* + *Rickettsia*; 7- *Leishmania* + *Ehrlichia* + *Rickettsia*; 8 – *Leishmania* + *Babesia* + *Ehrlichia* + *Rickettsia*;

Os valores de referência utilizados para os parâmetros do hemograma foram os recomendados pelo Laboratório de Análises Clínicas Professor M. Braço Forte (ANEXO I) e os valores de referência para os parâmetros do proteinograma foram os recomendados pelo Laboratório DNATech – Investigação Científica e Análise Molecular (ANEXO II).

4. Verificação de Hipóteses

Hipótese 1 – Os sinais clínicos dos animais do Grupo A (mono-infectados) são iguais aos dos animais do Grupo B (co-infecção);

Hipótese 2 – Os resultados do hemograma dos animais do Grupo A (mono-infectados) são iguais aos dos animais do Grupo B (co-infectados);

Hipótese 3 – Os resultados do proteinograma dos animais do Grupo A (mono-infectados) são iguais aos dos animais do Grupo B (co-infectados);

5. Técnicas de tratamento de dados

Elaborou-se uma base de dados em suporte de papel onde se registaram todos os valores das variáveis após análise individual de todas as fichas clínicas e que, posteriormente, se transpôs para a base de dados no programa SPSS 17.0 (Apêndice I). O tratamento estatístico dos dados foi efectuado no mesmo programa.

O presente estudo é constituído por duas partes: uma parte descritiva e uma segunda que consiste na verificação de hipóteses. Na primeira parte (descritiva), foi efectuada a descrição das características dos animais em relação a variáveis numéricas como a idade, o peso, a temperatura rectal e hemograma, com recurso a uma análise univariada, na qual se utilizaram medidas de estatística descritiva de tendência central (média, mediana e moda) e de dispersão

(desvio padrão, valores máximos e mínimos). Como expressão gráfica para a comparação entre as diversas variáveis numéricas utilizou-se a caixa de bigodes na comparação entre as medianas e o gráfico de erro na comparação entre as médias, nas situações consideradas relevantes.

Em relação à descrição das variáveis nominais, utilizaram-se medidas descritivas de frequência, nomeadamente, proporções.

Utilizaram-se testes estatísticos inferenciais não paramétricos por não se cumprirem os pressupostos dos testes paramétricos.

Para a comparação entre as medidas de tendência central, no que diz respeito à idade e ao peso, em dois grupos diferentes, utilizou-se o teste U de Mann-Whitney para duas amostras independentes (os pressupostos deste teste estão discriminados no parágrafo referente à verificação de hipóteses). Este teste foi utilizado para verificar se existiam diferenças com significado estatístico entre os dois grupos, no que diz respeito às variáveis idade e peso, de forma a poder eliminar estas duas variáveis como fontes de viés ou de confundimento na testagem de hipóteses.

Na segunda parte, verificação de hipóteses, foram utilizados testes estatísticos não paramétricos com tabelas de contingência entre as variáveis independentes (Mono-infecção e Co-infecção) e as várias variáveis nominais. Usou-se o Teste do Qui Quadrado de Pearson, e formularam-se as hipóteses nula e alternativa (Maroco, 2003). A hipótese nula (H_0) estabelece que não existem diferenças relativamente à distribuição das classes da variável e a hipótese alternativa (H_1) que existem diferenças significativas entre os grupos de onde foram extraídas as amostras. O nível de significância aceite para todas as tabelas de contingência foi $p < 0,05$. Nos casos em que não foi possível aplicar este teste por não se cumprirem todos os seus critérios (Metha & Patel, 1996) (o mínimo de valores esperados para todas as células deve ser pelo menos 5, para tabelas maiores que 2x2, o valor esperado de 1 é admissível desde que não haja mais de 20% das células com valores esperados inferiores a 5), utilizou-se o Teste Exacto de Fisher de independência para obter o valor exacto de p numa tabela de contingência 2x2. Para o Teste Exacto de Fisher também foram formuladas as hipóteses nula e alternativa de independência, com um nível de significância de $p < 0,05$.

Nos casos em que não era possível calcular o valor exacto de p através dos Teste Qui Quadrado de Pearson ou Exacto de Fisher, aplicou-se o Teste de Monte Carlo (Maroco, 2003). Este teste fornece uma estimativa do valor exacto de p do Teste Qui Quadrado de Pearson, sem os pressupostos do método assintótico (Mehta & Patel, 1996). O teste de

Monte de Carlo é um teste de amostragem repetida para obter uma estimativa do verdadeiro valor de p . O nível de significância aceite foi $p < 0,05$.

Para comparar os dois grupos relativamente a medidas de tendência central no que diz respeito às variáveis numéricas (temperatura rectal, hemoglobina, plaquetas e proteínas totais), utilizou-se, ainda, o Teste U de Mann-Whitney. Este teste de utilização preferencial ao t de Student para duas amostras independentes quando existe violação da normalidade ou para valores de n pequenos (como era o caso deste estudo) (Pestana & Gageiro, 2005) compara o centro de localização das duas amostras, como forma de detectar diferenças entre as duas populações. Formularam-se as hipóteses nula (H_0) e alternativa (H_1) do teste, que estabelecem que as duas populações são iguais em tendência central e que as duas populações não são iguais em tendência central, respectivamente. O nível de significância aceite foi $p < 0,05$.

6. Limitações do Estudo

O presente estudo apresenta limitações, na sua maioria decorrentes de se tratar de uma análise retrospectiva, a informação recolhida estar limitada aos dados disponíveis na ficha clínica de cada animal.

Este estudo, sendo um estudo clínico, não contempla padronização nem homogeneidade da amostra.

CAPÍTULO III – RESULTADOS

Este estudo comparativo foi realizado em dois grupos de cães, o Grupo A, representado por canídeos mono-infectados com *Leishmania infantum* e constituído por 17 animais e o Grupo B, constituído por 18 animais co-infectados com *Leishmania infantum* e pelo menos com um dos seguintes agentes patogénicos: *Babesia canis*, *Ehrlichia canis* e/ou *Rickettsia conorii*.

1. Descrição dos dois grupos segundo a raça, sexo, idade e peso

A distribuição dos animais incluídos nos dois grupos segundo a raça, sexo, idade e peso encontra-se no Apêndice II.

No Grupo A verificou-se que os animais de raça pura (13/17) constituíam a maior parte da amostra e pertenciam a 9 raças diferentes, sendo a *Boxer* a mais frequente (4/13), seguida da *Cocker Spaniel* (2/13). No Grupo B verificou-se que os animais de raça pura (12/18) também constituíam a maior parte da amostra e pertenciam a 10 raças diferentes, a *Pit Bull Terrier* e a *Rottweiler* foram as mais frequentes, neste grupo, ambas com 2/12 animais. Em relação ao sexo, no Grupo A observou-se uma predominância de animais de sexo masculino (12/17); num caso não foi possível conhecer o sexo por falta de informação. No Grupo B foi também predominante o sexo masculino (14/18).

No que diz respeito à idade verificou-se que no Grupo A, esta variou entre os 2 e os 12 anos, com uma média de $7,00 \pm 2,62$ anos, e moda de 6 anos. No Grupo B, não foi possível identificar a idade de um dos cães, e a idade variou entre os 2 e os 14 anos, com uma média de $5,76 \pm 3,13$ anos, e moda de 7 anos. A Figura 2 mostra a comparação entre as medianas das idades nos dois grupos.

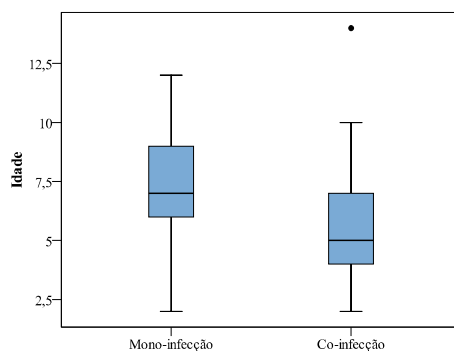


Figura 2 – Caixa de bigodes da variável idade nos dos grupos

Fez-se a comparação entre as medidas de tendência central (Apêndice VI) relativamente à idade dos cães dos dois grupos (Teste U de Mann-Whitney) não se tendo observado diferenças estatisticamente significativas ($p=0,14$).

O peso dos canídeos do Grupo A estava registado em 15 dos 17 casos. O peso médio foi de $28,35 \pm 9,26$ kg, variando entre os 11,6 e os 45 kg, com moda de 30 kg. Salienta-se que 13 cães tinham peso superior a 19 kg e que 2 tinham peso \leq a 12 kg.

No Grupo B, só foi possível identificar o peso em 16 dos 18 animais do grupo. O peso médio foi de $27,39 \pm 9,67$ kg, variando entre os 6 e os 45 kg, e com moda de 34 kg. A Figura 3 mostra a comparação entre as medianas do peso nos dois grupos.

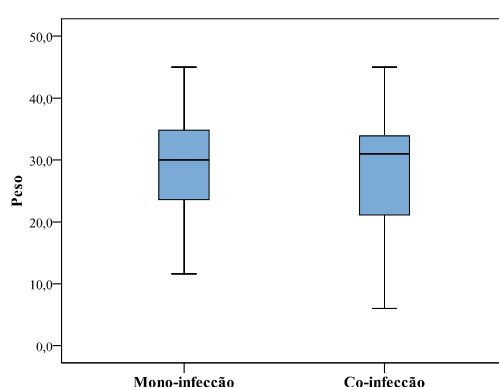


Figura 3 – Caixa de bigodes da variável peso nos dois grupos

Fez-se a comparação entre as medidas de tendência central (Apêndice VI) relativamente ao peso dos cães nos dois grupos (Teste U de Mann-Whitney), não se observando diferenças estatisticamente significativas ($p=0,74$)

2. Descrição dos dois grupos segundo o quadro clínico

Na Figura 4 estão representadas as principais alterações clínicas registadas nos animais de cada um dos grupos estudados.

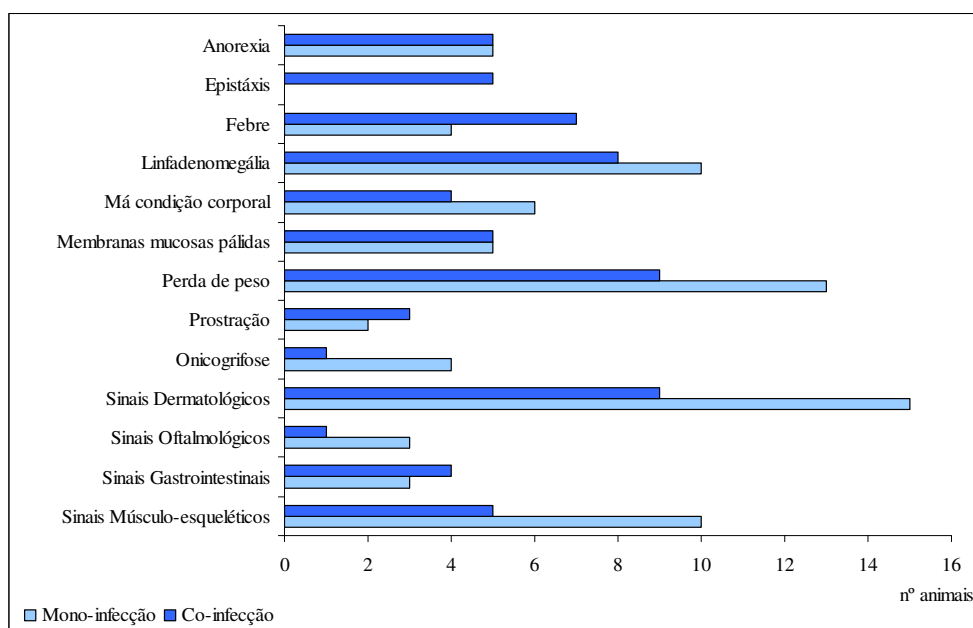


Figura 4 – Distribuição das principais alterações clínicas segundo os dois grupos

No Grupo A, os sinais do foro dermatológico foram os observados com mais frequência (15/17), seguindo-se a perda de peso (13/17), os sinais referentes ao aparelho músculo-esquelético (10/17), a linfadenomegália (10/17) e a má condição corporal (6/17).

Das alterações dermatológicas registadas (Apêndice III), salientam-se a seborreia (8/15) e a alopecia (4/15) como as mais frequentes neste grupo. Em relação à distribuição da alopecia, em 2 casos era peri-ocular e em 2 generalizada. Havia referência a lesões ulcerativas de difícil cicatrização localizadas nas orelhas, calos cutâneos, nódulos cutâneos e hiperqueratose do nariz em três animais.

A linfadenomegália (10/17) foi classificada como generalizada (Apêndice III) em 8 dos 10 animais, num animal havia referência a hipertrofia do linfonodo poplíteo e noutra hipertrofia dos linfonodos pré-escapular e mandibular.

Em relação ao aparelho músculo-esquelético (Apêndice III) registaram-se alterações em 10 animais, sendo a mais frequente a atrofia muscular, observada em 6 animais, dos quais 2 apresentavam atrofia muscular generalizada, 2 tinham atrofia dos músculos masséteres e temporais, 1 tinha atrofia dos músculos dos membros posteriores e outro tinha atrofia dos músculos masséteres, temporais e dos membros posteriores. A dor articular foi referida em 6 casos e claudicação em 4 animais.

A onicogrifose estava registada em quatro das 17 fichas clínicas analisadas.

As alterações clínicas mais frequentemente registradas nos 18 animais do Grupo B, foram a perda de peso (9/18), os sinais do foro dermatológico (9/18), a linfadenomegália (8/18), a febre (7/18) e os sinais referentes ao aparelho músculo-esquelético (5/18).

Estavam referidas alterações do foro dermatológico em 9 animais (Apêndice III), sendo as mais frequentes as lesões do tipo da seborreia seca generalizada (5/9), dermatite queratoseborreica (2/9) e alopecia (4/9). Dos dois animais que apresentavam alopecia, um deles tinha um quadro difuso e o outro um quadro localizado na zona peri-ocular. Havia, também, referência a lesões cutâneas localizadas em zonas específicas, nomeadamente lesões ulcerativas (4/9) nos cotovelos, pavilhão auricular e focinho. Outras lesões como calos cutâneos (2/9) e nódulos cutâneos (1/9) também estavam registradas.

Dos 8 animais com linfadenomegália (Apêndice III), 5 apresentavam-na de forma generalizada, 1 mostrava alteração no tamanho dos linfonodos sub-mandibular e pré-escapular e 2 animais aumento de tamanho do linfonodo poplíteo.

Verificou-se que 5 em 18 animais exibiam sintomatologia músculo-esquelética, claudicação (3/6) com dor articular e dificuldade de locomoção, e atrofia muscular em 2 cães.

Havia referência a epistáxis unilateral registada nas fichas clínicas de 5 canídeos.

Os dados relativos à temperatura rectal registada, constam no Apêndice III. A temperatura rectal foi registada em 17 animais do Grupo A e variou entre 38,00 °C a 39,30 °C, com uma média de $38,71 \pm 0,38$ °C (Figura 5). No Grupo B, não havia registo da temperatura de um dos cães, e esta variou entre os 37,7°C e os 40,8°C, com uma média $39,09 \pm 0,84$ °C (Figura 5).

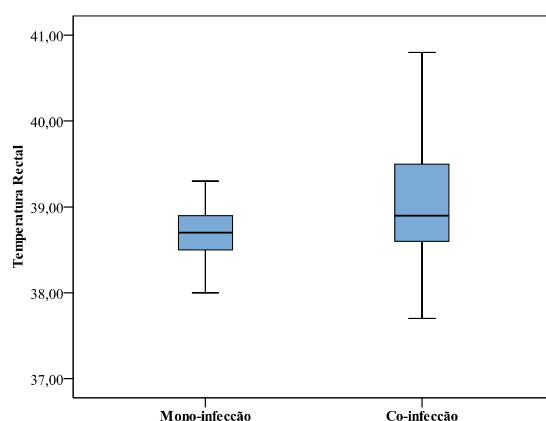


Figura 5 – Caixa de bigodes da variável temperatura rectal nos dois grupos

Quando se analisam as médias das temperaturas dos cães mono-infectados (3/17) e co-infectados (7/18) com febre verifica-se que as médias são de 39,3 °C e 39,9 °C, respectivamente.

Na análise da Figura 4, na qual é possível comparar as principais alterações clínicas registadas nos dois grupos, verifica-se que as alterações dermatológicas, a linfadenomegália, a perda de peso, os sinais músculo-esqueléticos e a onicogrifose foram mais frequentes no Grupo A, enquanto que a febre e a epistáxis foram as mais frequentes no Grupo B.

3. Descrição dos dois grupos segundo os resultados dos exames laboratoriais

No Apêndice V encontra-se discriminado o registo de todos os valores dos exames laboratoriais dos animais incluídos nos dois grupos.

3.1. Hematologia

A Tabela 5 apresenta as médias, desvios padrão, medianas, mínimos e máximos dos parâmetros do hemograma do Grupo A.

Parâmetro (unidades)	Referência	Média	Des. Padrão	Mediana	Mínimo	Máximo
Eritrócitos ($10^6/\mu\text{L}$)	5,5 - 8,5	4,8	1,3	4,9	2,4	6,7
Plaquetas ($10^3/\mu\text{L}$)	200 - 500	175,5	150,2	143,0	11,2	659,0
Hemoglobina (g/dL)	12 - 18	11,0	3,2	10,7	5,5	16,0
Hematócrito (%)	37 - 55	34,0	9,6	33,2	17,5	48,0
VCM (fL)	60 - 77	70,2	5,1	71,6	60,3	78,9
HCM (pg)	19,5 - 24,5	22,7	1,6	23,2	18,8	25,1
CHCM (g/dL)	32 - 36	32,3	1,2	32,1	30,2	34,0
Leucócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	6 - 17	8,9	3,5	7,7	5,1	17,0
Neutrófilos Segmentados ($/\mu\text{L}$)	3000 - 11500	6780,9	3013,4	5265	3284	13600
Linfócitos ($/\mu\text{L}$)	1000 - 4800	1195,4	753,1	992	185	2674
Monócitos ($/\mu\text{L}$)	150 - 1350	705	434,6	595	108	1758
Eosinófilos ($/\mu\text{L}$)	100 - 1250	238,1	219,9	182	0	702

Tabela 5 – Parâmetros do hemograma no Grupo A

Neste grupo verificou-se que as médias dos valores dos eritrócitos ($4,83 \times 10^6/\mu\text{L}$), da hemoglobina (11,02 g/dL) e das plaquetas ($175 \times 10^3/\mu\text{L}$) se encontravam abaixo do limite normal. A média dos valores dos leucócitos ($8,92 \times 10^3/\mu\text{L}$) estava dentro dos valores de referência, bem como as médias dos vários elementos celulares que constituem o leucograma.

As alterações hematológicas mais frequentemente registradas nos canídeos deste grupo foram a diminuição do número de eritrócitos (13/17), diminuição do hematócrito (11/17), diminuição da hemoglobina (11/17), e trombocitopenia (11/17); em 7 animais a amostra apresentava agregação plaquetária.

Relativamente às alterações da morfologia eritrocitária, verificou-se a presença de anisocitose (5/17), policromasia (5/17) e eritrócitos nucleados (2/17).

No que diz respeito ao leucograma, observou-se com maior frequência, leucopenia (4/17) e linfocitopenia (9/17).

A Tabela 7 apresenta as médias, desvios padrão, medianas, mínimos e máximos dos parâmetros do hemograma do Grupo B.

Parâmetro (unidades)	Referência	Média	Des. Padrão	Mediana	Mínimo	Máximo
Eritrócitos ($10^6/\mu\text{L}$)	5,5 - 8,5	4,6	1,8	4,1	2,0	8,6
Plaquetas ($10^3/\mu\text{L}$)	200 - 500	151,7	98,1	168,0	15,7	346
Hemoglobina (g/dL)	12 - 18	10,7	4,2	9,8	4,5	19,8
Hematócrito (%)	37 - 55	33,0	12,2	30,0	14,0	58,5
VCM (fL)	60 - 77	71,1	3,6	70,1	65,1	78,3
HCM (pg)	19,5 - 24,5	22,8	1,4	23,0	19,4	24,9
CHCM (g/dL)	32 - 36	32,3	1,3	32,4	28,8	34,2
Leucócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	6 - 17	11,8	6,1	10,4	3,5	24
Neutrófilos Segmentados ($/\mu\text{L}$)	3000 - 11500	8520,0	5066,3	6576,0	2984,0	18480
Linfócitos ($/\mu\text{L}$)	1000 - 4800	2252,0	2303,0	1537,0	208,0	8804
Monócitos ($/\mu\text{L}$)	150 - 1350	651,4	644,0	450,0	125,0	2640
Eosinófilos ($/\mu\text{L}$)	100 - 1250	266,1	312,6	100,0	0,0	814

Tabela 6 – Parâmetros do hemograma no Grupo B

Neste grupo observou-se que as médias dos valores dos eritrócitos ($4,60 \times 10^6/\mu\text{L}$), da hemoglobina (10,7g/dL) e das plaquetas ($151,7 \times 10^3/\mu\text{L}$), à semelhança do grupo A, se encontravam abaixo do limite normal. A média dos valores dos leucócitos ($11,80 \times 10^3/\mu\text{L}$), bem como as médias dos vários elementos celulares que constituem o leucograma, estavam dentro dos valores normais de referência.

As alterações hematológicas mais frequentemente registradas nos animais deste grupo foram a diminuição do número de eritrócitos (13/18), diminuição do hematócrito (13/18), diminuição da hemoglobina (12/18) e trombocitopenia (14/18), e em 5 animais a amostra apresentava

agregação plaquetária. Relativamente às alterações da morfologia eritrocitária, verificou-se a presença de anisocitose (1/18), policromasia (1/18) e eritrócitos nucleados (1/18).

No que diz respeito ao leucograma, observou-se com maior frequência leucopénia (3/18) e linfocitopénia (5/18).

3.2. Bioquímicas sanguíneas

O doseamento de ALT, fosfatase alcalina, ureia, creatinina e glucose foi realizado a 15 animais do Grupo A e a 7 do Grupo B. Dos 15 animais do Grupo A, com registo dos exames bioquímicos realizados verificou-se que a ureia sérica estava elevada em 7 animais, a creatinina e ALT estavam elevadas em 3 animais. Os níveis de glucose e de fosfatase alcalina estavam dentro dos valores de referência em todos os casos.

No Grupo B, verificou-se que os níveis de ureia sérica estavam elevados em 3 dos sete animais e os níveis de creatinina e ALT em 2. Os níveis de glucose e de fosfatase alcalina estavam dentro dos valores de referência em todos os 7 casos.

3.3. Proteinograma

Embora o proteinograma esteja incluído nos exames bioquímicos, por razões metodológicas e porque os resultados deste exame laboratorial fazem parte de uma das hipóteses a estudar, optou-se por individualizar a descrição desta variável.

No Grupo A obteve-se a informação sobre os resultados do proteinograma de 16 animais. As alterações mais frequentes observadas foram a hiperproteinémia (11/16), hipoalbuminémia (9/16), hiperbetaglobulinémia (7/16), hipergamaglobulinémia (13/16), e diminuição do rácio albumina/globulinas (14/16).

As alterações observadas com maior frequência no Grupo B foram a hiperproteinémia (7/16), hipoalbuminémia (11/16), hiperbetaglobulinémia (6/16), hipergamaglobulinémia (15/16), e diminuição do rácio albumina/globulinas (12/16).

3.4. Diagnóstico serológico e variação sazonal

O diagnóstico serológico constitui o principal critério de diagnóstico para a inclusão dos animais nos dois grupos (Apêndice VI)

O Grupo A era constituído por 17 cães infectados com *Leishmania infantum*. O diagnóstico foi realizado por imunofluorescência indirecta (IFI) em 16 animais e por punção medular com posterior análise por reacção de cadeia da polimerase (PCR) num dos casos.

No Grupo B, constituído por 18 cães co-infectados com *Leishmania infantum* e com pelo menos um dos seguintes agentes patogénicos *Babesia canis*, *Ehrlichia canis* e/ou *Rickettsia conorii*, realizou-se o diagnóstico serológico dos vários agentes por IFI em 18 animais, sendo que num deles a titulação para *Leishmania infantum* não foi conclusiva (1/80), tendo sido posteriormente confirmado o diagnóstico por PCR.

A Figura 6 apresenta as várias combinações de agentes de co-infecção observadas neste grupo. As co-infecções com três ou mais agentes foram mais frequentes (12/18) e as com dois agentes foram as menos frequentes (6/18). A co-infecção mais frequente (6/18) incluía três agentes, nomeadamente *Leishmania infantum*, *Babesia canis* e *Rickettsia conorii*, e a co-infecção menos frequente (1/18), incluía dois agentes, *Leishmania infantum* e *Ehrlichia canis*.

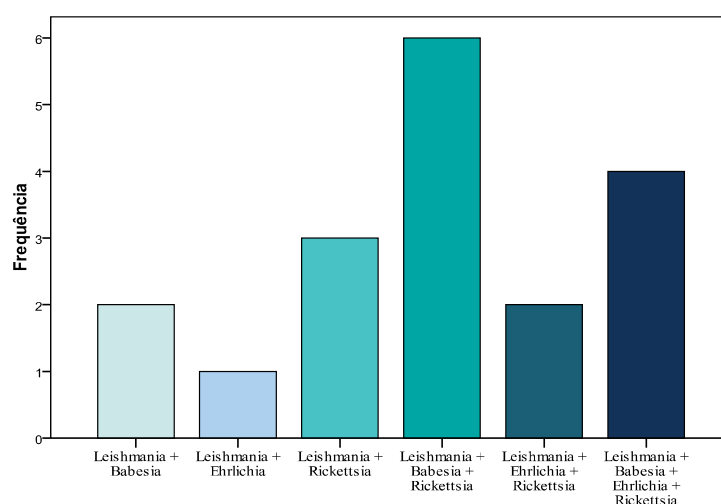


Figura 6 – Frequência das associações de co-infecções presentes no Grupo B

Foram diagnosticados casos durante todos os meses (Figura 7), no entanto verifica-se uma maior frequência nos meses de Março (5/17) e Julho (3/17), para o Grupo A e nos meses Fevereiro (3/18), Julho (4/18) e Agosto (3/17), para o Grupo B.

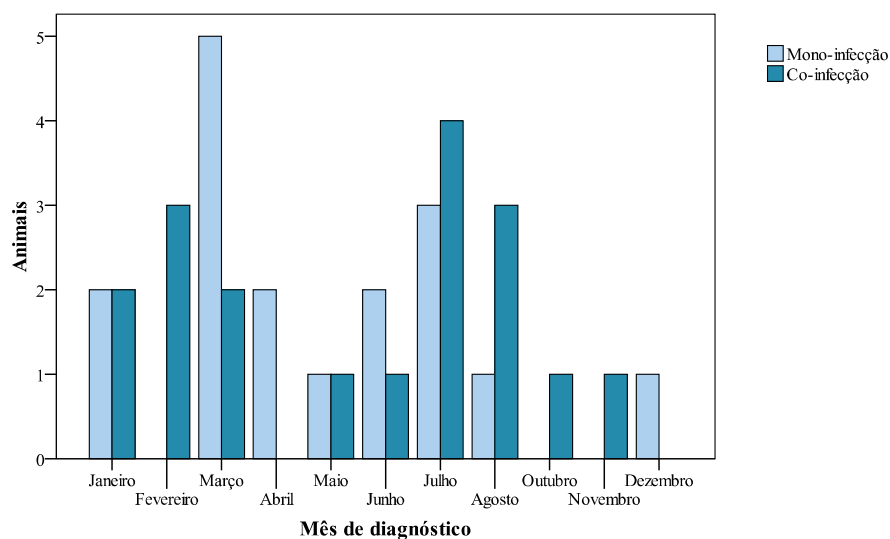


Figura 7 – Distribuição sazonal nos dois grupos

4. Verificação de Hipóteses:

4.1. Hipótese 1 – Os sinais clínicos dos animais do **grupo A** (mono-infectados) são iguais aos dos animais **do grupo B** (co-infectados)

Na Tabela 8 apresentam-se os resultados dos testes Qui Quadrado de Pearson e Exacto de Fisher usados para testar se existem diferenças entre os dois grupos quando se comparam os principais sinais clínicos registados.

Sintomas		Mono-infecção	Co-infecção	Teste	<i>p</i>
Sinais Dermatológicos	Sim	15	10	Exacto de Fisher	0,06
	Não	2	8		
Perda de Peso	Sim	13	9	Qui-Quadrado de Pearson	0,11
	Não	4	9		
Linfadenomegália	Sim	10	8	Qui-Quadrado de Pearson	0,40
	Não	7	10		
Sinais Músculo-Esqueléticos	Sim	8	5	Qui-Quadrado de Pearson	0,24
	Não	9	13		
Febre	Sim	4	8	Qui-Quadrado de Pearson	0,51
	Não	13	9		

Tabela 7 – Tabelas de contingência do tipo de infecção com as variáveis clínicas

Analisando os resultados obtidos, verifica-se que não existem diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos, em relação aos sinais dermatológicos ($p=0,06$), à perda de peso ($p=0,11$), à linfadenomegália ($p=0,40$), aos sinais músculo-esqueléticos ($p=0,24$) e à febre ($p=0,51$).

Apesar de a variável febre não estar associada estatisticamente a nenhum dos grupos, procurou-se analisar se existiam diferenças em relação à temperatura rectal registada nos dois grupos. A Figura 8 mostra o gráfico de erro e a caixa de bigodes que representam as diferenças entre as médias e as medianas dos dois grupos.

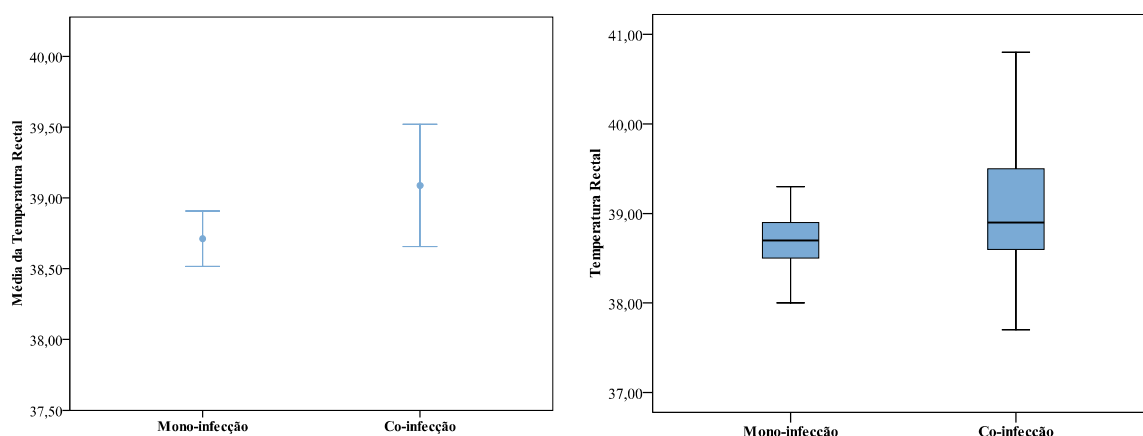


Figura 8 – a) e b) Gráfico de erro e caixa de bigodes da temperatura rectal nos dois grupos

No Grupo A, a média da temperatura rectal foi de $38,71 \pm 0,38$ °C, e a mediana 38,7 °C e no Grupo B a média da temperatura rectal foi de $39,09 \pm 0,84$ °C e a mediana de 38,9°C.

Fez-se a comparação entre as medidas de tendência central (Apêndice VI) relativamente à temperatura rectal dos cães nos dois grupos (Teste U de Mann-Whitney), não se observando diferenças estatisticamente significativas ($p=0,13$). Aceita-se a hipótese nula deste teste, segundo a qual as duas amostras independentes são idênticas.

4.1.1. Confirmação

Os sinais clínicos dos animais do Grupo A (mono-infectados) são iguais aos dos animais do Grupo B (co-infectados).

4.2. Hipótese 2 – O resultados do hemograma dos animais do **grupo A** (mono-infectados) são iguais aos dos animais do **grupo B** (co-infectados)

Na Tabela 9 apresentam-se os resultados dos testes Qui Quadrado de Pearson, Exacto de Fisher e Monte Carlo para testar se existem diferenças entre os dois grupos quando se comparam as variáveis do hemograma seleccionadas.

Alterações hematológicas		Mono-infecção	Co-infecção	Teste	<i>p</i>
Anemia	Sim	11	12	Qui quadrado de Pearson	0,70
	Não	4	5		
Plaquetas	Trombocitose	1	0	Monte Carlo	0,57
	Normal	5	4		
	Trombocitopénia	11	14		
Neutrófilos	Neutrofilia	1	5	Monte Carlo	0,13
	Normal	16	12		
	Neutropénia	0	1		
Eosinófilos	Normal	14	10	Qui-Quadrado de Pearson	0.09
	Eosinopénia	3	8		

Tabela 8 – Tabelas de contingência do tipo de infecção com as variáveis do hemograma

Após análise dos resultados verifica-se que não existem diferenças com significado estatístico entre os dois grupos, em relação à presença de anemia ($p=0,70$), às variações nas plaquetas ($p=0,57$), às variações nos neutrófilos ($p=0,13$) e às variações nos eosinófilos ($p=0,09$).

Apesar dos níveis de hemoglobina e das plaquetas não estarem associadas estatisticamente a nenhum dos grupos, procurou-se analisar se existiam diferenças em relação a estas duas variáveis nos dois grupos. A Figura 9 mostra o gráfico de erro e a caixa de bigodes que representam as diferenças entre as médias e as medianas dos dois grupos relativamente aos valores de hemoglobina e das plaquetas.

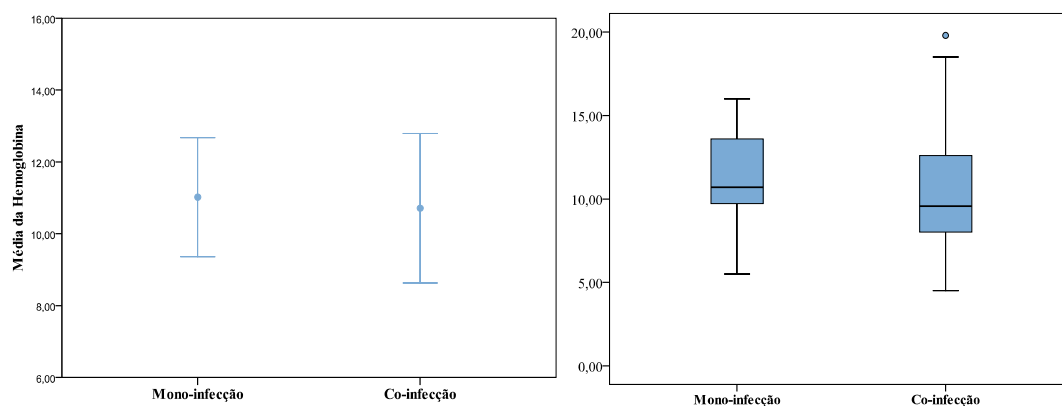


Figura 9 –a) e b) Gráfico de erro e caixa de bigodes da variável hemoglobina

No Grupo A, a média dos valores da hemoglobina foi de $12,02 \pm 3,22$ g/dL, e a mediana 10,70 g/dL e no Grupo B a média dos valores de hemoglobina foi de $10,71 \pm 4,19$ g/dL e a mediana de 9,57 g/dL.

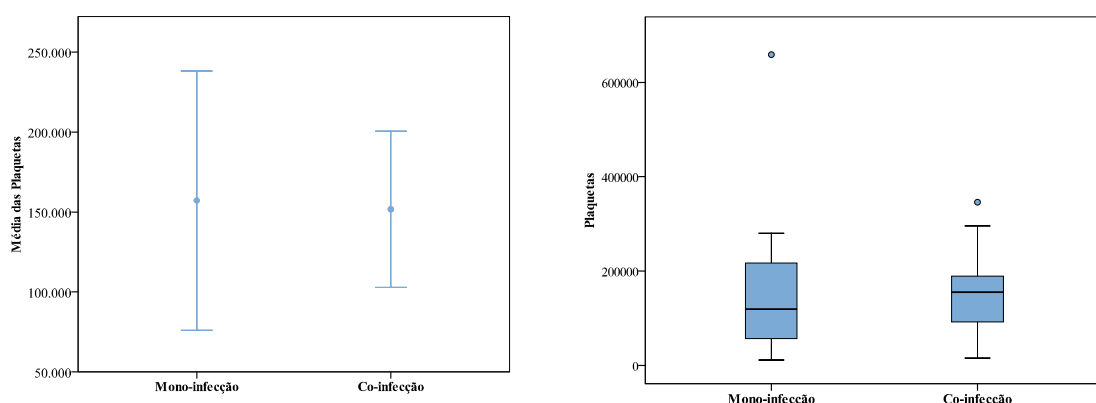


Figura 10 – a) e b) Gráfico de erro e caixa de bigodes da variável plaquetas

No Grupo A, a média dos valores das plaquetas foi de $157,19 \pm 157,62 \times 10^3/\mu\text{L}$, e a mediana $119,00 \times 10^3/\mu\text{L}$ e no Grupo B a média dos valores de plaquetas foi de $151,70 \pm 98,05 \times 10^3/\mu\text{L}$ e a mediana de $155,50 \times 10^3/\mu\text{L}$.

Fez-se a comparação entre as medidas de tendência central (Apêndice VI) relativamente aos valores das duas variáveis nos dois grupos (Teste U de Mann-Whitney), e não se observaram diferenças estatisticamente significativas para a hemoglobina ($p=0,52$) e para as plaquetas

($p=0,63$). Para ambas as variáveis aceita-se a hipótese nula deste teste, segundo a qual as duas amostras independentes são idênticas.

4.2.1. Confirmação

Os resultados do hemograma (hemoglobina e plaquetas) dos animais do Grupo A (mono-infectados) são iguais aos dos animais do Grupo B (co-infectados)

4.3. Hipótese 3 – Os resultados do proteinograma dos animais do **grupo A** (mono-infectados) são iguais aos dos animais do **grupo B** (co-infectados)

Na Tabela 9 apresentam-se os resultados dos testes Qui Quadrado de Pearson, Exacto de Fisher e Monte Carlo utilizados para testar se existem diferenças entre os dois grupos quando se comparam os níveis registados da Albumina, Proteínas totais, $\alpha 1$, $\alpha 2$, β e γ globulinas, bem como do rácio Albumina/Globulinas.

Variáveis		Mono-infecção	Co-infecção	Teste	p
Albumina	Normal	7	5	Qui Quadrado de Pearson	0,47
	Hipoalbuminémia	9	11		
Proteínas Totais	Hiperproteinémia	10	8	Monte Carlo	0,17
	Normal	4	8		
	Hipoproteinémia	2	0		
$\alpha 1$ globulina	Aumentada	2	4	Monte Carlo	0,55
	Normal	8	5		
	Diminuída	6	7		
$\alpha 2$ globulina	Aumentada	5	4	Monte Carlo	0,53
	Normal	11	10		
	Diminuída	0	2		
β globulina	Aumentada	3	7	Exacto de Fisher	0,11
	Normal	13	9		
γ globulina	Aumentada	15	15	Exacto de Fisher	1,00
	Normal	1	1		
	Diminuída	0	0		
Rácio	Normal	2	4	Exacto de Fisher	0,65
Albumina/Globulinas	Diminuído	14	12		

Tabela 9 – Tabelas de contingência do tipo de infecção com as variáveis do proteinograma

Quando se analisaram os resultados verificou-se que não existem diferenças com significado estatístico entre os dois grupos, em relação à variação dos níveis de albumina ($p=0,47$), proteínas totais ($p=0,17$), $\alpha 1$ globulina ($p=0,55$), $\alpha 2$ globulina ($p=0,53$), β globulina ($p=0,11$), γ globulina ($p=1,00$) e rácio albumina/globulinas ($p=0,65$).

Apesar dos níveis das proteínas totais não estarem associadas estatisticamente a nenhum dos grupos, procurou-se analisar se existiam diferenças em relação a esta variável nos dois grupos. A Figura 11 mostra o gráfico de erro e a caixa de bigodes que representam a diferença entre as médias e as medianas dos dois grupos relativamente aos valores das proteínas totais.

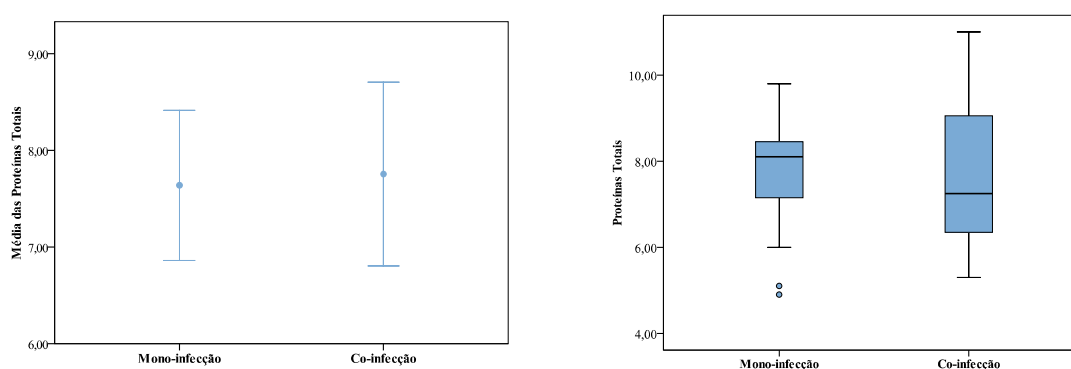


Figura 11 – a) e b) Gráfico de erro e caixa de bigodes da variável proteínas totais

No Grupo A, a média dos valores das proteínas totais foi de $7,64 \pm 1,40$ g/dL, e a mediana 8,10 g/dL e no Grupo B a média dos valores das proteínas totais foi de $7,76 \pm 1,78$ g/dL e a mediana de 7,25 g/dL.

Fez-se a comparação entre as medidas de tendência central (Apêndice VII) relativamente aos valores das proteínas totais nos dois grupos (Teste U de Mann-Whitney), e não se observaram diferenças estatisticamente significativas ($p=0,91$). Aceita-se a hipótese nula deste teste, segundo a qual as duas amostras independentes são idênticas.

4.3.1. Confirmação

Os resultados do proteinograma dos animais do Grupo A (mono-infectados) são iguais aos dos animais do Grupo B (co-infectados).

CAPÍTULO IV

1. DISCUSSÃO

Realizou-se um estudo retrospectivo e analítico com o objectivo de comparar as alterações clínicas e laboratoriais em dois grupos de cães: um grupo constituído por animais infectados com *Leishmania infantum* e outro constituído por animais infectados com *Leishmania infantum* e pelo menos um dos seguintes agentes, *Babesia canis*, *Ehrlichia canis* e *Rickettsia conorii*. Os critérios de inclusão nos grupos basearam-se em sinais clínicos e laboratoriais bem como positividade serológica a um ou mais agentes transmitidos por vectores.

Nas duas populações estudadas observou-se que a maioria dos canídeos era de raça pura. No grupo de mono-infecção (Grupo A), as raças mais representadas foram a *Boxer* (4/13) e a *Cocker Spaniel* (2/13). No grupo de co-infecção (Grupo B), as raças *Pit Bull Terrier* (2/12) e *Rottweiler* (2/12) foram as mais representadas. Apesar de se terem encontrado diferenças nas raças mais representadas em cada grupo, considera-se que este facto pode estar relacionado com factores aleatórios de escolha pessoal e preferencial dos proprietários por determinadas raças.

Apesar de os canídeos de todas as raças serem susceptíveis à infecção por *Leishmania* sp. (Solano-Gallego, et al., 2000), está demonstrado que existe influência genética na susceptibilidade ou resistência à infecção (Solano-Gallego, et al., 2009; Baneth, 2010). As raças *Boxer*, *Rottweiler*, Pastor Alemão e *Cocker Spaniel* são mais susceptíveis à infecção (Abranches, Silva-Pereira, Conceição-Silva, Santos-Gomes & Janz, 1991; Castagnaro, et al., 2007; Solano-Gallego, et al., 2009; Baneth, 2010), enquanto que os cães de raça Podengo de Ibiza, raça autóctone das Ilhas Baleares (Solano-Gallego, et al., 2000), são mais resistentes à infecção devido ao facto de desenvolverem uma resposta imunitária predominantemente de tipo celular (Solano-Gallego, et al., 2000; Ferrer, 2002b). Também está descrito que os cães de raça Caniche e *Yorkshire Terrier* possuem menor tendência para desenvolverem a doença clínica (Miranda, et al., 2008).

Os animais de raça Pastor Alemão estão descritos na literatura como sendo mais susceptíveis à infecção por *Ehrlichia canis* (Neer & Harus, 2006) e a desenvolvem quadros clínicos mais graves e consequentemente com pior prognóstico. Esta mesma raça também está referido como tendo uma elevada prevalência de infecção por *Rickettsia rickettsii* (Greene & Breitschwerdt, 2006). Os cães de raça *American Pit Bull Terrier* apresentam uma elevada prevalência de babesiose e esta pode estar relacionada com a susceptibilidade natural da raça ou a factores ambientais que levam à elevada exposição ao vector ou ao agente, como por

exemplo o contacto com sangue infectado durante as lutas de cães ou através de mordeduras, e devido ao seu carácter agressivo e territorial são utilizados como animais de guarda, passando mais tempo no exterior e, consequentemente, maior exposição aos vectores.

No que diz respeito às co-infecções não se encontraram na literatura referências a raças infectadas por *Leishmania* e outros agentes. No entanto, os animais com leishmaniose clínica são mais susceptíveis a infecções concomitantes devido à imunossupressão que esta doença induz (Ferrer, 1999; 2002b).

Na amostra total deste estudo estavam representados ambos os sexos, no entanto, tanto no grupo de mono-infecção (Grupo A) como no grupo de co-infecção (Grupo B), observou-se uma predominância de animais do sexo masculino, 12/16 e 14/18, respectivamente. A maior predominância de canídeos do sexo masculino encontrada poderá estar relacionada com o caso de estes se encontrarem em maior número na população, ou devido ao facto de ser uma zona rural, onde os machos pelo seu carácter mais agressivo e dominante são frequentemente utilizados como animais de guarda, permanecendo por esta razão mais tempo no exterior. Estes resultados estão de acordo com alguns estudos internacionais (Ciaramellha, et al., 1997; Koutinas, et al., 1999; Miranda, et al., 2008) e com um estudo nacional realizado pelo Observatório Nacional de Leishmanioses (Maia, et al, 2011) em que, também foi encontrada uma maior incidência de infecção em animais do sexo masculino. Alguns estudos epidemiológicos realizados em cães infectados com *Leishmania infantum* não relatam predisposição de género (Abranches, et al., 1991; Amusategui, et al., 2003; Ciaramella & Corona, 2003b).

No que diz respeito aos animais co-infectados, não se encontraram estudos que refiram predisposição de género para infecção. Um estudo realizado em Itália (Solano-Gallego, et al., 2006a) e outro em Espanha (Solano-Gallego, et al., 2006b) associaram o sexo masculino a maior risco de infecção e seropositividade para *Rickettsia conorii*.

A idade dos animais incluídos neste estudo variou entre os 2 e os 12 anos, com uma média de idade de 7 ($\pm 2,6$) anos, no grupo de mono-infecção (Grupo A), e entre os 2 e os 14 anos, com uma média de 5,8 ($\pm 3,1$) anos, para o grupo co-infecção (Grupo B). Verificou-se que as diferenças observadas nas médias das idades dos dois grupos não tinham significado estatístico ($p=0,14$). Quando se analisa a distribuição etária verifica-se que predominam animais adultos e velhos, que provavelmente terão maior probabilidade de exposição prévia a artrópodes vectores do que os animais mais jovens. Por outro lado, o longo período de incubação da doença, que varia de alguns meses a anos, pode conduzir a que a doença se manifeste apenas nos animais mais velhos.

Alguns autores (Ferrer, 2002b; Castagnaro, et al., 2007; Baneth, 2010) referem que a prevalência da leishmaniose é bimodal, com um pico entre os 2 e os 4 e outro a partir dos 7 anos de idade (Abranches, et al., 1991; Baneth, 2010) o que está de acordo com os resultados encontrados. É pouco frequente encontrar animais com menos de 1 ano de idade com manifestação clínica da doença (Kontos & Koutinas, 1993; Strauss-Ayali & Baneth, 2000) o que poderá dever-se ao prolongado período de incubação (Noli, 1999; Roze, 2005; Baneth, 2006, 2010; Miro, Cardoso, Pennisi, Oliva & Baneth, 2008), e pelo facto de ser uma doença crónica e de instalação insidiosa (Baneth, 2006). Miranda e colaboradores (2008) referem que o desenvolvimento clínico de leishmaniose em animais mais velhos pode estar relacionado com a deficiência natural do sistema imunitário, e com o aparecimento de doenças concomitantes que podem alterar o equilíbrio entre o hospedeiro e o parasita.

Relativamente ao peso dos animais, verificou-se que o peso médio dos animais do grupo de mono-infecção (Grupo A) foi de 28,4 ($\pm 9,3$) kg e do grupo de co-infecção (Grupo B) de 27,4 ($\pm 9,8$) kg. Verificou-se que as diferenças observadas nas médias dos pesos dos dois grupos não tinham significado estatístico ($p=0,74$). Estes resultados sugerem que a doença se manifesta predominantemente em cães de porte grande, mas este facto pode ser devido a um viés do estudo que por ter sido realizado numa zona rural, onde existem muitas quintas e moradias ajardinadas, faz pressupor que existam muitos cães de guarda. Na bibliografia consultada não se encontraram referências que relacionem o peso com a susceptibilidade à leishmaniose, no entanto está descrito que a doença tem maior prevalência em machos e em animais de raças grandes, como as raças Pastor Alemão, *Rottweiler* e *Boxer* (Miranda, et al., 2008; Solano-Gallego, et al., 2009).

Neste estudo, os sinais e sintomas clínicos mais comuns manifestados pelos cães do grupo de mono-infecção (Grupo A) foram: dermatológicos (15/17), nomeadamente a seborreia (8) e a alopecia (4); a perda de peso (13/17); os sinais músculo-esqueléticos (10/17), como a atrofia muscular (6), a dor articular (6) e a claudicação (4); a linfadenomegália (10/17), que era generalizada em 8 casos; e a má condição corporal (6/17). Todos os sinais e sintomas encontrados no estudo estão de acordo com o referido na bibliografia consultada (Ferrer, et al., 1988; Ferrer, 1999; Koutinas, et al., 1999; Noli, 1999; Natami, et al., 2000; Roze, 2005; Baneth, 2006; Castagnaro, et al., 2007; Solano-Gallego, et al., 2009).

No que diz respeito às alterações dermatológicas, que foram os sinais mais frequentes neste grupo, alguns autores (Ferrer, et al., 1988; Ferrer, 1999; Koutinas, et al., 1999; Baneth, 2006; Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008) referem que são as manifestações mais comuns da

doença, e são observadas em 56 a 90% dos canídeos afectados (Strauss-Ayali & Baneth, 2000; Baneth, 2006).

Neste estudo, a linfadenomegália estava presente em 10/17 cães, o que corresponde a aproximadamente a 59% da população. A linfadenomegália é um sinal consistentemente encontrado em canídeos com leishmaniose (Noli, 1999; Castagnaro, et al., 2007) e esta alteração pode afectar apenas um linfonodo, no entanto está descrito que é mais comum existir linfadenomegália generalizada (Roze, 2005; Baneth, 2006; Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008). A percentagem encontrada no estudo realizado é inferior à descrita na bibliografia, que se situa entre 65,2% (Koutinas, et al., 1999), 89% (Ciaramella & Corona, 2003) e 100% (Natami, et al., 2000) dos animais infectados. Estas variações podem dever-se a diferenças metodológicas dos estudos. Por outro lado, como este estudo foi realizado retrospectivamente e com base em registos clínicos existentes, pode existir variação individual dos profissionais clínicos com subvalorização no diagnóstico e registo de linfadenomegália.

No presente estudo, as alterações músculo-esqueléticas foram observadas em mais de metade dos animais do grupo de mono-nfecção (Grupo A), o que parece estar em contradição com o descrito na literatura (Koutinas, et al., 1999; Noli, 1999; Solano-Gallego, et al., 2009) em que é referido que os problemas a nível locomotor não são muito frequentes nos cães com leishmaniose. Este facto pode atribuir-se a várias condições: os animais podem sofrer de afecções osteo-articulares concomitantes e ter existido rigor no registo da história clínica e exame físico por parte do médico veterinário. De facto, a amostra é constituída predominantemente por animais de porte grande e como as consultas não foram especificamente dirigidas ao diagnóstico de leishmaniose, é possível que pudessem coexistir afecções músculo-esqueléticas frequentes em cães de raças grandes, como por exemplo, a displasia da anca, osteoartroses, entre outras.

A onicogribose, encontrada em 4 dos 17 animais (aproximadamente 24%), é referenciada na bibliografia (Koutinas, et al., 1999; Noli, 1999; Natami, et al., 2000; Dias, et al., 2008) como um sinal frequente na leishmaniose canina, com percentagens variando entre 20 a 30,5% (Ciaramella, et al., 1997; Koutinas, et al., 1999; Baneth, 2010).

Relativamente às alterações clínicas observadas nos animais do grupo de co-infecção (Grupo B), verificou-se que, de uma forma geral, são sobreponíveis às do grupo de mono-infecção. No entanto, salienta-se que a febre foi um sinal observado com mais frequência no grupo de co-infecção (7/18) quando comparado com o grupo de mono-infecção (4/17), o que pode dever-se à presença de agentes co-infectantes uma vez que quadros agudos com

manifestações febris são raros (Moreno, et al., 1999; Ciaramella & Corona, 2003b) em cães infectados apenas com *Leishmania* spp. O facto de no presente estudo se terem identificado 4 cães com febre e com o diagnóstico de leishmaniose, pode relacionar-se com episódios febris descritos em alguns casos de leishmaniose canina (Ciaramella, et al., 1997; Koutinas, et al., 1999; Noli, 1999; Strauuss-Ayali & Baneth, 2000; Baneth, 2006) e à eventual presença de doenças infecciosas concomitantes, como por exemplo infecção secundária das lesões cutâneas.

Os sinais e sintomas músculo-esqueléticos (5/18) e dermatológicos (9/18) foram menos frequentes no grupo de co-infecção (Grupo B). Estes resultados são controversos uma vez que estes animais também estavam infectados com *Leishmania* spp., e se a menor frequência de sintomas músculo-esqueléticos parece estar de acordo com a literatura referida, já a menor frequência de alterações dermatológicas não parece estar de acordo com a presença daquela infecção. No entanto a subjectividade e a valorização das alterações dermatológicas pelos clínicos poderá ter condicionado o seu registo. Por outro lado, a co-infecção com outros agentes poderá ter contribuído para o desequilíbrio entre o portador assintomático e a *Leishmania*, e como consequência antecipar as manifestações clínicas da doença e, posterior, diagnóstico de leishmaniose.

A epistáxis foi observada em 5 dos 18 animais do grupo de co-infecção (Grupo B), não tendo sido registado nenhum caso no grupo de mono-infecção (Grupo A). É um sintoma descrito em cães com leishmaniose com percentagens que variam entre 10-37% (Ciaramella, et al., 1997; Koutinas, et al., 1999; Noli, 1999; Baneth, 2006). Neste estudo, o facto de não se ter identificado nenhum caso de epistáxis nos cães mono infectados pode dever-se ao carácter intermitente da epistáxis e, por este motivo, ter sido subvalorizado, omitido ou não observado pelos proprietários dos animais. Os 5 cães co-infectados que apresentaram episódios de epistáxis tinham como agente de co-infecção uma riquetsia (*Rickettsia conorii* e/ou *Ehrlichia canis*). Estes resultados estão de acordo com os descritos na literatura que refere que a epistáxis é um sintoma frequente em cães com erliquiose e riquetsiose (Ciaramella, et al., 1997).

Nos animais mono-infectados (Grupo A) verificou-se que as médias dos valores dos eritrócitos, hemoglobina e plaquetas se encontravam abaixo dos limites do normal. As alterações que se observaram com mais frequência neste grupo foram a diminuição do número de eritrócitos (13/17), da hemoglobina (11/17), do hematócrito (11/17) e das plaquetas (11/17). Em mais de metade dos animais observou-se anemia, maioritariamente normocítica e normocrómica (média dos valores de VCM e CHCM dentro dos limites de referência), não

regenerativa ou fracamente regenerativa, o que está de acordo com a bibliografia consultada (Ciaramella, et al., 1997; Koutinas, et al., 1999; Moreno, et al., 1999; Noli, 1999; Staruss-Ayali & Baneth, 2000; Roze, 2005; Baneth, 2006; Castagnaro, et al., 2007; Fonseca & Villa de Brito, 2008; Solano-Gallego, et al., 2009), que descreve que este tipo de anemia ocorre com frequência em cães com leishmaniose. Esta anemia pode dever-se ao carácter inflamatório crónico da doença (Kontos & Koutinas, 1993; Koutinas, et al., 1999), à hemólise imunomediada (Baneth, 2006), ou à infiltração medular do parasita, provocando diminuição da hematopoiese (Ferrer, 2002a; Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008). A anemia pode também ser provocada pela diminuição do tempo de vida médio dos eritrócitos devido aos efeitos tóxicos da ureia e diminuição da produção da eritropoetina, secundários à insuficiência renal (Day, Mackin & Littlewood, 2000). Pode, ainda, ser agravada por hemorragias do tracto gastrointestinal ou por episódios de epistáxis (Koutinas, et al., 1999).

A morfologia eritrócitária encontrava-se normal na maior parte das amostras sanguíneas. Contudo observaram-se alterações, sendo as mais frequentes a anisocitose (5/17) e a policromasia (5/17) o que revela que em alguns casos pode existir uma certa regeneração com produção de eritrócitos imaturos (Day, et al., 2000). Os eritrócitos nucleados foram observados numa pequena proporção das amostras (2/17). A sua ocorrência está descrita em associação com casos graves de anemia (Day, et al., 2000), o que no presente estudo só se verificou num animal.

Neste estudo, a trombocitopénia foi observada em 11 animais, contudo pode existir um viés nestes resultados uma vez que em sete casos existia agregação plaquetária. A trombocitopénia descrita nos casos de leishmaniose pode dever-se a consumo excessivo devido à presença de hemorragias, processos imunomediados, sequestro esplénico, ou a défice de produção associado a processos imunomediados ou afecção de medula óssea (Yin, 2007).

Em relação ao leucograma, embora as médias dos valores dos leucócitos se encontrassem dentro dos valores de referência, observou-se leucopénia em quatro animais e linfopénia em nove. Está descrito que a leucopénia e a linfopénia está presente em 25% dos canídeos com leishmaniose (Amusategui, et al., 2003; Ferrer, 2002a).

Relativamente aos animais co-infectados (Grupo B), as alterações hematológicas mais frequentemente observadas foram semelhantes às encontradas nos animais mono-infectados (Grupo A), nomeadamente, diminuição do número de eritrócitos (13/18), diminuição do hematócrito (13/18), diminuição da hemoglobina (12/18) e trombocitopénia (14/18). A maioria dos animais apresentava uma anemia normocítica e normocrómica e trombocitopénia. Esta trombocitopénia média pode estar sobrevalorizada, devido ao facto de existirem cinco

animais que apresentavam agregação plaquetária. Na bibliografia consultada referente a animais com leishmaniose e infecções concomitantes, não se encontraram quaisquer referências a alterações hematológicas características.

Nos animais mono-infectados (Grupo A), as alterações laboratoriais identificadas foram o aumento da ureia sérica (7/15), da creatinina (3/15) e ALT (3/15). Moreno e colaboradores (1999) referem que na leishmaniose o aumento dos valores séricos de ureia e creatinina podem estar relacionados com a insuficiência renal secundária à deposição de complexos imunes na membrana basal do glomérulo (Baneth, 2006). Em relação à função hepática, uma pequena proporção dos cães (3/15) apresentaram alterações. Estão descritas alterações a nível de ALT, AST e FAZ (Baneth, 2006; Fonseca & Villa de Brito, 2008), no entanto a lesão hepática habitualmente não é grave e os valores têm tendência a normalizar com a instituição da terapêutica (Ciaramella & Corona, 2003).

Exames bioquímicos sanguíneos foram realizadas a 7 animais do grupo de co-infecção (Grupo B) e as alterações mais frequentes, semelhantes ao encontrado para o grupo da mono-infecção (Grupo A), foram o aumento da ureia sérica (3/7), aumento da creatinina (2/7) e aumento da ALT (2/7). Estas alterações não são relevantes dado o pequeno número de animais com exames laboratoriais realizados.

O proteinograma foi realizado a 16 animais do grupo da mono infecção (Grupo A) e a 16 animais do grupo da co-infecção (Grupo B) e as principais alterações registadas em ambos os grupos foram hiperproteinémia, hipoalbuminémia, hiperbetaglobulinémia, hipergamaglobulinémia e diminuição do rácio albumina/globulinas, o que está de acordo com a bibliografia (Kontos & Koutinas, 1993; Ciaramella & Corona, 2003). A hiperproteinémia (Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008) é atribuída à hiperglobulinémia, principalmente das β e γ globulinas, mantendo-se as α globulinas dentro dos limites fisiológicos (Kontos & Koutinas, 1993; Amusatogui, et al., 2003; Ciaramella & Corona, 2003). A hiperproteinémia associada a hipoalbuminémia (Koutinas, et al., 1999; Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008) repercute-se na diminuição do rácio albumina/globulinas (Ciaramella, et al., 1997; Koutinas, et al., 1999; Baneth, 2006), também observada no presente estudo.

As infecções concomitantes com três ou mais agentes foram as que se observaram com maior frequência (*Leishmania infantum*, *Babesia canis* e *Rickettsia conorii*) e as menos frequentes foram as com dois agentes (*Leishmania infantum* e *Ehrlichia canis*). Esta ultima associação de agentes patogénicos têm sido referida na bibliografia como frequente (Ciaramella, et al., 1997; Noli, 1999; Roze, 2005; Baneth, 2006; Mekuzas, Grandoni, Oliva, Manzillo & Baneth,

2009). Mekuzas e colaboradores (2009) sugerem a possibilidade de que a erliquiose possa contribuir para a manifestação clínica de leishmaniose.

Foram diagnosticados casos de leishmaniose em todos os meses do ano, com maior frequência nos meses de Março e Julho para os animais mono-infectados (Grupo A) e nos meses de Fevereiro, Julho e Agosto para os animais co-infectados (Grupo B). Estes resultados estão de acordo com o referido na bibliografia. De facto, o insecto vector, *Phlebotomus perniciosus*, possui actividade máxima durante o início da Primavera até ao final do Verão (Ciaramella & Corona, 2003; Fernández-Bellon, et al., 2008), no entanto a doença não possui carácter sazonal (Fernández-Bellon, et al., 2008), sendo diagnosticada o ano inteiro. A diferença entre os dois grupos na distribuição anual dos diagnósticos, provavelmente, deve-se ao acaso. Na bibliografia consultada não se encontrou distribuição sazonal dos agentes de co-infecção estudados quando associados à *Leishmania*.

Em relação à verificação de hipóteses constatou-se que os sinais clínicos dos animais mono-infectados são iguais aos dos animais co-infectados. Não se verificaram diferenças com significado estatístico relativamente aos sinais dermatológicos, perda de peso, linfadenomegália, sinais músculo-esqueléticos e febre entre os dois grupos. Apesar de não existirem referências na literatura consultada, poder-se-ia esperar que os animais co-infectados manifestassem um quadro clínico mais grave do que os animais monoinfectados, nomeadamente no que diz respeito à perda de peso, às alterações músculo-esqueléticas e à febre, por se pressupor que a presença de um ou mais agentes co-infectantes pudesse agravar a depressão imunitária já induzida pela leishmaniose. Para justificar estes resultados pode-se assinalar algumas limitações metodológicas associadas às características do estudo, retrospectivo e baseado em registo clínicos. Assim, a perda de peso e as alterações músculo-esqueléticas são variáveis que estão sujeitas a alguns viéses, e dependem da informação transmitida pelos proprietários, do acompanhamento regular do animal na clínica, e, também, de critérios subjectivos do médico veterinário. Contudo, em relação à temperatura rectal, que é uma variável numérica e quantificável também não se verificaram diferenças entre as médias dos dois grupos, mas quando se compararam as médias das temperaturas dos animais com febre em ambos os grupos, verificou-se que os animais co-infectados tinham uma temperatura média que era 0,6 °C superior à dos mono-infectados.

Em relação à segunda hipótese: os resultados do hemograma dos animais monoinfectados são iguais aos dos animais co-infectados, não se verificaram, nos dois grupos, diferenças estatisticamente significativas relativamente às seguintes variáveis: anemia, plaquetas, neutrófilos e eosinófilos. No grupo A (animais mono-infectados), a média dos valores de

hemoglobina foi de $11,02 \pm 3,22$ g/dL e no grupo B (animais co-infectados) foi de $10,71 \pm 4,19$ g/dL, não se tendo observado diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos. Relativamente às plaquetas, a média dos valores observados foi de $157,19 \pm 157,62 \times 10^3/\mu\text{L}$ no grupo A e $151,70 \pm 98,05 \times 10^3/\mu\text{L}$ no grupo B, não se tendo observado diferenças com significado estatístico entre os dois grupos. Podia esperar-se que a co-infecção com hemoparasita pudesse agravar o quadro hematológico da leishmaniose, o que não se verificou no presente estudo. Na ausência de referências bibliográficas que comparem os parâmetros hematológicos entre animais mono-infectados e co-infectados com os agentes estudados, não é possível determinar a influência da co-infecção no quadro hematológico da leishmaniose.

A terceira hipótese: os resultados do proteinograma dos animais mono-infectados são iguais aos dos animais co-infectados, não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos relativamente às seguintes variáveis: albumina, proteínas totais, $\alpha 1$ globulinas, $\alpha 2$ globulinas, β globulinas, γ globulinas e rácio albumina/globulinas. Apesar dos níveis de proteínas não estarem estatisticamente associados a nenhum dos grupos, testou-se se a média dos valores de proteínas totais no grupo A ($7,64 \pm 1,40$ g/dL) era igual ao do grupo B ($7,76 \pm 1,78$ g/dL), e também não se observaram diferenças estatisticamente significativas. Não se observaram diferenças entre os dois grupos no que diz respeito ao proteinograma, e estas semelhanças eram previsíveis uma vez que os animais de ambos os grupos têm doenças que envolvem mecanismos imunitários que provocam hiperproteinémia com hiperglobulinémia e hipoalbuminémia, associada a um rácio albumina/globulina diminuído. Na bibliografia consultada não se encontraram referências que possam fundamentar uma possível influência da co-infecção no rácio albumina/globulina.

2. CONCLUSÃO

As doenças transmitidas por vectores englobam um grupo de doenças infecciosas provocadas por diversos agentes patogénicos e transmitidas por diferentes vectores (carraças, mosquitos, entre outros). Estas doenças representam um desafio diagnóstico aos médicos veterinários devido à sintomatologia inespecífica e muitas vezes semelhante entre as diferentes doenças e também porque as co-infecções com dois ou mais agentes podem apresentar-se com um quadro clínico atípico e sinais ou sintomas sobreponíveis.

Em zonas endémicas, o diagnóstico de doenças transmitidas por vectores depende de vários factores que incluem a exposição ao vector, factores inerentes ao hospedeiro (idade, sexo, raça, sistema imunitário) e ao agente patogénico (patogenicidade). Também em zonas endémicas de vectores artrópodes, e perante um quadro clínico infeccioso inespecífico deve, obrigatoriamente, ter-se em consideração o diagnóstico diferencial de leishmaniose e outras doenças infecciosas, nomeadamente babesiose, ehrliquiose e rickettsiose.

A leishmaniose é uma doença crónica de carácter insidioso e debilitante e, actualmente, a cura parasitológica não existe. Pelo contrário as doenças transmitidas por ixodídeos descritas neste estudo, são potencialmente curáveis e, de forma geral, com o tratamento adequado possuem bom prognóstico.

Na prática clínica veterinária tem-se vindo a verificar um aumento do número de casos diagnosticados de leishmaniose, provavelmente devido à maior sensibilidade por parte dos médicos veterinários, pela disponibilidade de técnicas de diagnóstico mais sensíveis e específicas e pelo seu menor custo.

De uma forma geral perante o diagnóstico de leishmaniose, o médico veterinário inicia o tratamento e não são excluídas outras doenças infecciosas concomitantes. Estas só são pesquisadas nos casos em que existe má resposta à terapêutica instituída, agravamento do quadro clínico ou aparecimento de sinais ou sintomas inconsistentes.

Este estudo veio demonstrar que os sinais clínicos e as alterações laboratoriais são semelhantes nos cães infectados com *Leishmania infantum* e nos cães co-infectados com *Leishmania infantum*, e pelo menos um dos seguintes agentes: *Babesia canis*, *Ehrlichia canis* e *Rickettsia conorii*. Assim, face a um animal com sintomatologia clínica suspeita de leishmaniose, deve-se sempre considerar a hipótese de existir um ou mais agentes co-infectantes e realizar os testes adequados. Esta pesquisa e posterior identificação de outro agente pode ter repercussões importantes quer a nível do prognóstico, evolução da doença e

de qualidade de vida do animal, porque, de um modo geral, estas infecções têm tratamento e cura ao contrário da leishmaniose.

Portugal é um país com elevada prevalência de leishmaniose e tem condições climatéricas favoráveis ao crescimento de artrópodes vectores de doenças comumente chamadas de hemoparasitoses. Curiosamente existem poucos estudos epidemiológicos e clínicos sobre animais co-infectados com leishmaniose e outros agentes etiológicos de hemoparasitoses. Este estudo, com as limitações inerentes a um estudo retrospectivo, entre outras, pretende chamar à atenção para a possibilidade de co-infecções em cães com leishmaniose. De facto, considera-se necessário, no futuro, aprofundar a investigação pessoal nas áreas de epidemiologia e clínica de modo a confirmar os resultados sugeridos neste estudo.

Actualmente, com a introdução de uma vacina profilática é previsível que a epidemiologia e o curso clínico da leishmaniose sofram alterações, contudo esta evolução não invalida a necessidade de excluir outros agentes co-infectantes perante um caso de leishmaniose, uma vez que aparentemente, conforme este estudo demonstrou, o quadro clínico e as alterações laboratoriais podem ser sobreponíveis nos casos de infecção e de co-infecção.

CAPÍTULO V - Descrição Das Actividades Realizadas Em Estágio

O estágio curricular decorreu na clínica veterinária AZEVET, localizada em Brejos de Azeitão, distrito de Setúbal, sob a orientação científica da Professora Doutora Maria Manuela Grave Rodeia Espada Niza, com a duração de 24 semanas (de 1 de Fevereiro de 2010 a 1 de Agosto de 2010). A clínica veterinária funciona nos dias úteis das 9 às 24 horas, nos sábados, domingos e feriados das 10 às 18 horas. Este horário é assegurado em turnos rotativos, pela equipa de médicos veterinários e pelos estagiários.

O corpo clínico é constituído por quatro elementos que asseguram o funcionamento das consultas de medicina interna, cirurgias, e métodos complementares de diagnóstico, nomeadamente ecografias, radiografias e análises clínicas. A clínica conta, ainda, com a colaboração de três funcionárias auxiliares. A equipa técnica está vocacionada para o ensino, recebendo regularmente, alunos estagiários.

As actividades desenvolvidas na clínica veterinária AZEVET incluem consultas de medicina, cirurgias de animais de companhia bem como consultas de especialidade na área dos novos animais de companhia (exóticos). A clínica recebe ainda animais referenciados por outras clínicas ou hospitais, quer para consultas de especialidade ou cirurgia, quer para a realização de exames complementares de diagnóstico.

Tal como referido anteriormente, o estágio decorreu durante seis meses, com uma carga horária semanal de 40 horas distribuída por turnos de 8 horas/dia e uma escala de fim-de-semana quinzenal.

Neste período foram realizadas várias actividades, tanto em animais de companhia (canídeos e felídeos) como em animais exóticos (aves, répteis e pequenos mamíferos). A Figura 12 representa a distribuição percentual dos animais observados, segundo a espécie, durante o período do estágio.

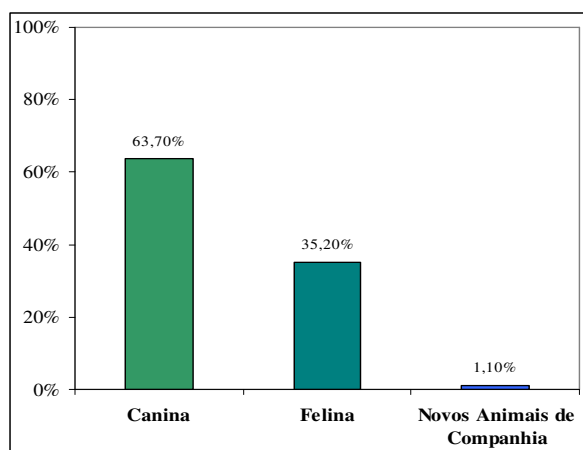


Figura 12 – Distribuição dos animais por espécies

Na Figura 12 verifica-se que os canídeos foram a espécie de animais observada com maior frequência (63,7%), seguindo-se os felídeos e, por fim, os novos animais de companhia (1,10%). No Apêndice VII constam alguns dos casos clínicos considerados interessantes assistidos durante o estágio.

O estudante estagiário tem um papel activo na prática clínica diária, o que lhe permite a aquisição e consolidação de conhecimentos teóricos e práticos. Colabora nas consultas externas participando na contenção dos animais, na elaboração da história clínica, no exame físico, na preparação de medicação e aplicação de protocolos terapêuticos. Participa ainda na realização de exames complementares de diagnóstico, como análises bioquímicas sanguíneas, análises de urina, raspagens de pele e citologias, radiografias, electrocardiogramas e ecografias.

Relativamente às cirurgias o estagiário colabora na realização dos exames pré-cirúrgicos, na preparação pré-operatória e nos cuidados pós-cirúrgicos do paciente. Durante as cirurgias, exerce diferentes funções, nomeadamente ajudante de cirurgião, anestesista ou circulante.

Na área de internamento o estudante estagiário, com a supervisão dos médicos veterinários assistentes, é responsável pelos animais internados, cujas funções incluem a vigilância da evolução clínica do animal, monitorização regular dos parâmetros vitais, administração correcta e atempada da terapêutica estipulada, prestação de cuidados básicos de higiene e bem-estar. Acompanha ainda os animais na recuperação anestésica após as cirurgias ou na sequência de exames de diagnóstico que requerem sedação.

Na Tabela 10 apresenta-se a distribuição das actividades realizadas durante o período de estágio.

Actividades	Animais de Companhia	Novos animais de Companhia
	%	%
Cirurgia	10	23
Consultas	47	38
Internamento	8	7
Radiografia	14	23
Ecografia	14	7
Electrocardiograma	2	0
Eutanásia	5	0
Total	100	100

Tabela 10 – Distribuição percentual das actividades realizadas durante o período de estágio

As consultas foram as actividades desenvolvidas com maior frequência durante o estágio, quer em animais de companhia (47%) quer em consultas de novos animais de companhia (38%), salientando-se o facto de estes últimos constituírem uma percentagem mínima (1,5%) do total de consultas realizadas.

Em relação aos exames complementares de diagnóstico, as radiografias e ecografias foram os exames mais realizados, quer no grupo dos animais de companhia quer no grupo dos novos animais de companhia.

Durante este período a autora assistiu a 71 cirurgias, familiarizando-se com alguns dos procedimentos cirúrgicos mais rotineiros na prática clínica (Tabela 12), tendo colaborado como ajudante de cirurgião (ovariohisterectomia, cirurgia de otomatomia, orquiectomia), circulante e anestesista nas restantes cirurgias

	Animais de Companhia	Novos animais de Companhia
CIRURGIAS	%	%
Ovariohisterectomia	38,24	0
Orquiectomia	26,47	0
Mastectomia	7,35	0
Destartarização	1,47	0
Nodulectomia	5,88	0
Resolução de sobrecrescimento dentário	0	100
Amputação de dígito I	1,47	0
Hérnia perineal	2,94	0
Resolução de otomatomia	2,94	0
Cistotomia	1,47	0
Resolução de prolapso da glândula de Harder	1,47	0
Amputação de vértebra caudal	1,47	0
Reconstrução das almofadas plantares	1,47	0
Nefrotomia com remoção de cálculo	1,47	0
Resolução de hérnia diagramática	1,47	0
Remoção de pólipos auricular	1,47	0
Ruptura do ligamento cruzado cranial	1,47	0
Recessão da cabeça do fémur	1,47	0
Total	100	100

Tabela 11 – Distribuição percentual das cirurgias assistidas durante o período de estágio

As cirurgias do tracto genital foram as que se realizaram com mais frequência nos animais de companhia durante o período do estágio, nomeadamente a ovariohisterectomia (38,24%) e a orquiectomia (26,47%). Nos novos animais de companhia, as cirurgias assistidas foram a resolução cirúrgica de sobrecrecimento dentário em porquinho-da-índia.

Este estágio constituiu um marco de grande importância no culminar da formação académica da autora.

A integração na clínica e nas suas rotinas diárias foi fácil desde o início, devido ao bom acolhimento por parte dos profissionais que nela trabalhavam. Com eles aprendeu a utilizar, de uma maneira metódica e esquematizada, os conhecimentos teóricos adquiridos durante o seu percurso académico, e ainda a realizar uma abordagem “humanizada” não só dos animais, mas também dos seus proprietários, compreendendo os seus principais receios, ansiedades e constrangimentos. Aprendeu a ter a serenidade necessária para dar as boas notícias, mas também, as mais difíceis.

Foi no estágio na clínica veterinária AZEVET que contactou pela primeira vez com a realidade prática da vida veterinária, e sente-se marcada pelos testemunhos de profissionalismo, dedicação e empenho dos seus profissionais no tratamento dos animais doentes, bem como pela forma amistosa e generosa como a receberam e integraram.

BIBLIOGRAFIA

- Abranches, P., Silva-Pereira, M. C. D., Conceição-Silva, F. M., Santos-Gomes, G. M., & Janz, J. G. (1991) Canine Leishmaniasis: Pathological and ecological factors influencing transmission of infection. *Journal of Parasitology*, 77 (4), 557-561.
- Afonso, M. O., & Alves-Pires, C. (2008). Bioecologia dos vectores. In G. M. Santos-Gomes & I. M. Fonseca (Eds.), *Leishmaniose canina* (pp. 27-40). Lisboa: Chaves Ferreira - Publicações S.A.
- Aguirre, E., Sainz, A., Dunner, S., Amusatogui, I., López, L., Rodríguez-Franco, F., Luaces, I., Cortés, O. & Tesouro, M. A. (2004). First isolation and molecular characterization of *Ehrlichia canis* in Spain. *Veterinary Parasitology*, 125, 365-372.
- Alexandre-Pires, G. M., & Correia, J. J. (2008). Patogenia e lesões da leishmaniose canina. In G. Santos-Gomes & I. P. Fonseca (Eds.), *Leishmaniose Canina* (pp. 53-68). Lisboa: Chaves Ferreira.
- Alexandre, N. M. L. (2005). *Estudo clínico e epidemiológico da febre botonosa, ehrlichiose canina e borreliose de Lyme numa população de cães domésticos do Algarve*. Dissertação de Mestrado em Saúde Pública Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Técnica de Lisboa.
- Alexandre, N., Santos, A. S., Nuncio, M. S., Sousa, R. d., Boinas, F., & Bacellar, F. (2008). Detection of *Ehrlichia canis* by polymerase chain reaction in dogs from Portugal. *The Veterinary Journal*, doi:10.1016/j.tvjl.2008.03.025.
- Alvar, J., Cañavate, C., Molina, R., Moreno, J., Nieto, J. (2004). Canine leishmaniasis. *Advances in Parasitology [abstract]*, 57, 1-88.
- Amusatogui, I., Sainz, A., Rodriguez, F., & Tesouro, M. A. (2003). Distribution and relationships between clinical and biopathological parameters in canine leishmaniasis. *Journal of Epidemiology* 18, 147-156.
- Bacellar, F., Dawson, J. E., Silveira, C. A., & Filipe, A. R. (1995). Antibodies against *Rickettsiaceae* in dogs of Setúbal, Portugal. *Cent Eur J Public Health*, 3(2), 100-102.
- Baneth, G. (2006). Leishmaniasis. In C. E. Greene (Ed), *Infectious diseases of the dog and cat* (3rd ed., pp 685-695). Philadelphia: Elsevier, Inc.
- Baneth, G. (2010). Canine Leishmaniasis. In Proceedings of 35th annual world congress of the World Small Animal Veterinary Association Geneva, Switzerland, 2-5 June.
- Baneth, G., Day, M., Roura, X., & Shaw, S. (2005). Leishmaniosis. In S. E. Shaw & M. J. Day (Eds.), *Arthropod-borne Infectious Diseases of the Dog and Cat*. London: Manson Publishing Ltd.
- Beugnet, F., & Marié, J. L. (2009). Emerging arthropod-borne diseases of companion animals in Europe. *Veterinary Parasitology*.
- Baneth, G., Koutinas, A. F., Solano-Gallego, L., Bourdeau, P., & Ferrer, L. (2008). Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends in Parasitology*, 24(7), 324-30. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18514028>

- Beugnet, F., & Marié, J.-L. (2009). Emerging arthrop-borne diseases of companion animals in Europe. *Veterinary Parasitology*.
- Birkenheuer, A. J. (2004). *Canine Babesiosis: Epidemiological, Molecular and Therapeutic Investigations*. . Faculty of North Carolina State University, Raleigh.
- Boozer, A. L., & Macintire, D. K. (2003). Canine babesiosis. *Vet Clin Small Animal*, 33, 885-904.
- Bourdeiseau, G. (2006). Canine babesiosis in France. *Veterinary Parasitology*, 138, 118-125
- Breitschwerdt, E. B. (1997). Rickettsioses. In S. J. Ettinger & E. C. Feldman (Eds.), *Tratado de Medicina Interna Veterinária* (4^a ed., Vol. 1). São Paulo: Monole.
- Breitschwerdt, E. B. (2007a). How I Treat Anaplasmosis of Cats, Dogs, Horses, Mice and Men. SEVC Proceedings 2007, Southern European Veterinary Conference Retrieve 3-Jan-2011.
- Breitschwerdt, E. B. (2007b). *Spotted Fever Group Rickettsioses*. Paper presented at the SEVC Proceedings, 2007, Raleigh.
- Camacho, A. T., Pallas, E., Gestal, J. J., Guitián, F. J., & Olmeda, A. S. (2001). Babesia canis infection in a splenectomized dog. *Bull Soc Pathol Exot*, 94(1), 17-19.
- Campino, L., Riça Capela, M.J., Maurício, I.L., Ozensoy, S., Abranches, P. (1995). O Kala-Azar em Portugal.IX. A região do Algarve: inquérito epidemiológico sobre o reservatório canino no concelho de Loulé. *Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas*,3-4, 189-194.
- Cardoso, L., Costa, A., Tuna, J., Vieira, L., Eyal, O., Yisaschar-Mekuzas, Y., Oliva, G., Paltrinieri, S., Solano-Gallego, L., Roura, X. & Zini, E. (2008). *Babesia canis* and *Babesia vogeli* infections in dogs from northern Portugal. *Veterinary Parasitology*, 156, 199-204.
- Cardoso, L., Yisaschar-Mekuzas, Y., Rodrigues, F. T., Costa, A., Machado, J., Diz-Lopes, D. & Baneth, G. (2010). Canine babesiosis in northern Portugal and molecular characterization of vector-borne co-infections. *Parasites & Vectors*, 3-27. [Cortesia do Professor Doutor Luís Cardoso]
- Castagnaro, M., Crotti, A., Fondati, A., Grandoni, L., Lubas, G., Maroli, M., et al. (2007). Canine Leishmaniasis: Guidelines for diagnosis, staging, therapy, monitoring and prevention. Part i: Diagnostic approach and classification of the patient affected by leishmaniasis and management of dogs with proteinuria., from www.gruppoleishmania.org/files/veterinaria_2007_3ng.pdf
- Ciaramella, P., & Corona, M. (2003a). Canine Leishmaniasis: Therapeutic Aspects. *Compendium*, 25(5), 370-375.
- Ciaramella, P., & Corona, M. (2003b). Canine leishmaniasis: clinical and diagnostic aspects. *Compendium*, 25, 370-375.
- Ciaramella, P., Oliva, G., Luna, R. D., Grandoni, L., Ambrosio, R., Cortese, L., Scalone, A. & Persechino, A. (1997). A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Veterinary Record*, 141, 539-543.

- Ciarlini, P. C., Valadares, T. C., Ikeda-Garcia, F. A., Marcondes, M., & Lima, V. M. F. (2010). Leucograma e metabolismo oxidativo dos neutrófilos de cães com leishmaniose visceral antes e após o tratamento com antimoniato de maglúmina e alopurinol. *Ci. Anim. Bras., Goiânia*, 11(2), 369-375.
- Committee for Medicinal Products for Veterinary Use [CMPVU]. (2011). *Canileish - Leishmania infantum excreted secreted proteins (ESP)*: European Medicines Agency.
- Corrales, G. M. (2007). Leishmaniosis canina: situación actual en Europa, diagnóstico y control. *Acta Scientiae Veterinariae*, 35(Suppl 2), 227-229.
- Cringoli, G., Rinaldi, L., Capuano, F., Baldi, L., Veneziano, V., & Capelli, G. (2002). Serological survey of *Neospora caninum* and *Leishmania infantum* co-infection in dogs. *Veterinary Parasitology*, 106(4), 307-313.
- Dantas-Torres, F. (2008). Canine vector-borne diseases in Brazil. *Parasites & Vectors*, 1:25, 1-17.
- Dantas-Torres, F., & Figueiredo, L. A. (2006). Canine babesiosis: A Brazilian perspective. *Veterinary Parasitology*, 141, 197-203.
- Day, M., Mackin, A., & Littlewood, J. (2000). Anaemia. In B.-B. S. A. V. Association (Ed.), *BSAVA Manual of Canine and Feline Haematology and Transfusion Medicine* (pp. 29-42). Gloucester: British Small Animal Veterinary Association.
- Dias, E. L., Batista, Z. S., Guerra, R. M. S. N. C., Clabrese, K. S., Lima, T. B., & Abreu-Silva, A. L. (2008). Canine Visceral Leishmaniasis (CVL): Seroprevalence, clinical, hematological and biochemical findings of dogs naturally infected in an endemic area of São José Ribamar municipality, Maranhão State, Brazil. *Ciência Animal Brasileira*, 9(3), 740-745.
- Doas, E. L., Batista, Z. S., Guerra, R. M. S. N. C., Clabrese, K. S., Lima, T. B., & Abreu-Silva, A. L. (2008). Canine Visceral Leishmaniasis (CVL): Seroprevalence, clinical, hematological and biochemical findings of dogs naturally infected in an endemic area of São José Ribamar municipality, Maranhão State, Brazil. *Ciência Animal Brasileira* 9 (3), 740-745.
- Duarte, M. T. T. R. (2008). Riquetsioses do grupo das febres exantemáticas em cães domésticos em Portugal: revisão bibliográfica e estudo retrospectivo. Universidade Técnica de Lisboa - Faculdade de Medicina Veterinária Lisboa.
- Ettinger, S. J., & Feldman, E. C. (2005). *Textbook of Veterinary Internal Medicine* (6th ed.). St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders.
- Fang, R., Ismail, N., Soong, L., Popov, V. L., Whitworth, T., Bouyer, D. H., Walker, D. H. (2007). Differential Interaction of Dendritic Cells with *Rickettsia conorii*: Impact on Host Susceptibility to Murine Spotted Fever Rickettsiosis. *Infection and Immunity*, 75(6), 3112-3123.
- Felix, N., Mouro, S., Vilela, C. L., Peleteiro, M. C., Ferreira, A. J. A., Niza, M. M. R. E. (2008). Canine leishmaniasis with nephrotic syndrome and aortic and caudal vena cava thromboembolism. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 18(5), 526-531.

- Fernández-Bellon, H., Solano-Gallego, L., Rodríguez-Cortés, A., Ferrer, L., Gallego, M., Alberola, J., et al. (2008). Little evidence of seasonal variation of natural infection by *Leishmania infantum* in dogs in Spain. *Veterinary Parasitology*, 155, 32-36.
- Ferrer, L. (1999). Clinical aspects of canine leishmaniasis. Proceedings of the Internacional Canine Leishmaniasis Forum, Barcelona. *Hoochst Roussel Vet*, 6-10.
- Ferrer, L. (2002a). Leishmaniosis canina: Actualización en diagnóstico y terapeutica. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*(Supl 118), 17-46.
- Ferrer, L. (2002b). Canine leishmaniasis: evaluation of the immunocompromised patient. In Proceedings of the 27th annual World Small Animal Veterinary Association. Granada(Spain), 3-6 October.
- Ferrer, L., Juanola, B., Ramos, J. A., & Ramis, A. (1991). Chronic colitis due to *Leishmania* infection in two dogs. *Veterinary Parasitology*, 28, 342-343.
- Ferrer, L., Rabanal, R., Fondevila, D., Ramos, J. A., & Domingo, M. (1988). Skin lesions in canine leishmaniasis. *Journal of Small Animal Practice*, 29, 381-388.
- Figueiredo, T. C. D. (2007). *Estudo da prevalência de doenças associadas a vectores em canídeos domésticos no distrito de Bragança*. Faculdade de Medicina de Lisboa - Universidade de Lisboa, Lisboa.
- Gal, A., Loeb, E., Yisaschar-Mekuzas, Y., & Baneth, G. (2007). Detection of *Ehrlichia canis* by PCR in different tissues obtained during necropsy from dogs surveyed for naturally occurring canine monocytic ehrlichiosis. *The Veterinary Journal*, doi: 10.1016/j.tvjl.2007.01.013.
- Galvão, M. A. M., Silva, L. J. d., Nascimento, E. M. M., Calic, S. B., Sousa, R. d., & Bacellar, F. (2005). Riquetsioses no Brasil e Portugal: ocorrência, distribuição e diagnóstico. *Revista de Saúde Pública*, 39(5), 850-856.
- García, A. T. C. (2006). Piroplasma infection in dogs in northern Spain. *Veterinary Parasitology*, 138, 97-102.
- Gopegui, R. R., Peñalba, B., Goicoa, A., Espada, Y., Fidalgo, L. E., & Espino, L. (2007). Clinico-pathological findings and coagulation disorders in 45 cases of canine babesiosis in Spain. *The Veterinary Journal*, 174, 129-132.
- Graham, A. L., Cattadori, I. M., Lloyd-Smith, J. O., Ferrari, M. J., & Bjornstad, O. N. (2007). Transmission consequences of coinfection: cytokines writ large? *TRENDS in Parasitology*.
- Greene, C. E., & Breitschwerdt, E. B. (2006). Rocky Mountain Spotted Fever, Murina Typhuslike Disease, Rickettsialpox, Typhus, and Q Fever. In C. E. Greene (Ed.), *Infectious Diseases of the dog and cat* (3rd ed.). Philadelphia: Saunders.
- Harrus, S., Lior, Y., Ephroe, M., Grisaru-Soen, G., Keysary, A., Strenger, C., Jongejan, F., Warner, T. & Baneth, G. (2007). *Rickettsia conorii* in Humans and Dogs: A seroepidemiologic Survey of Two Rural Villages in Israel. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 77(1), 133-135.

- Harrus, S., Waner, T., Jongejan, F., & Cornelissen, A. W. C. C. (1999). Recent Advances in Determining the Pathogenesis of Canine Monocytic Ehrlichiosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(9), 2745-2749.
- Hauschild, S., Shayan, P., & Schein, E. (1995). Characterization and comparison of merozoite antigens of different *Babesia canis* isolates by serological and immunological investigations. *Parasitology Research*, 81, 638-642.
- Irwin, P. J. (2005). Babesiosis and Cyrauxzoonosis. In S. E. Shaw & M. J. Day (Eds.), *Arthropod-borne infectious diseases of the dog and cat* (pp. 63-77). London: Mason Publishin/The Veterinary Press. [Cortesia de Professor Doutor Peter Irwin]
- Irwin, P. J. (2009). Canine babesiosis: from molecular taxonomy to control. *Parasites & Vectors*, 2(Suppl 1), S4.
- Jacobson, L. S. (2006). The South African form of severe and complicated canine babesiosis: Clinical advances 1994-2004. *Veterinary Parasitology*, 138, 126-139.
- Keller, N., Jacobson, L. S., Nel, M., Clerq, M. d., Thompson, P. N., & Schoeman, J. P. (2005). Prevalence and Risk Factors of Hypoglycemia in Virulent Canine Babesiosis. *J Vet Intern Med*, 18, 265-270.
- Kelly, P. J., Mathewman, L. A., Manson, P. R., Courtney, S., Katsande, C., & Rukwava, J. (1992). Experimental infection of dogs with a Zimbabwean strain of Rickettsia conorii. *J Trop Med Hyg*, 95, 322-326.
- Kidd, L. B. (2006). *Molecular characterization of rickettsial diseases in dogs*. North Carolina State University, Raleigh.
- Kommenou, A., & Koutinas, A. F. (2007). Ocular manifestations of some canine infectious and parasitic diseases commonly encountered in the Mediterranean *EJCAP*, 17(3).
- Kontos, V. J., & Koutinas, A. F. (1993). Old world canine leishmaniasis. *Compedium*, 15, 949-959.
- Koutinas, A. F., Polizopoulou, Z. S., Saridomichelakis, M. N., Agryriadis, D., Fytianou, A., & Plevraki, H. G. (1999). Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989-1996). *Journal of American Animal Hospital Association*, 35, 376-383.
- Lobetti, R. (2000). Canine Babesiosis. In M. J. Day, A. Mackin & J. D. Littlewood (Eds.), *BSAVA Manual of Canine and Feline Haematology and Transfusion Medicine* (pp. 85-90). Gloucester: British Small Animal Veterinary Association.
- Lobetti, R. (2004). Canine and Feline Babesiosis. *Proceedings of 29th annual world congress of the World Small Animal Veterinary Association, Rhodes(Greece)*, 6-9 October.
- Lobetti, R. (2005). *The pathophysiology of renal and cardiac changes in canine babesiosis*.
- Lobetti, R., & Jacobson, L. S. (2001). Renal involvement in dogs with babesiosis. *Journal of South African Veterinary Association*, 72(1), 23-28.
- Macintire, D. K. (2005). *Emerging vector-borne diseases. In: New developmentes in ectoparasitic-related diseases*.

- Maia, C., Maurício, I., Campino, L., Cardoso, L., Carvalho, L. M. d., Afonso, O., Neves, R. & Villa de Brito, T. (2011). Primeiro relatório regular da LEISHnet (ONLeish - Observatório Nacional de Leishmanioses). *Veterinary Medicine, Jan/Fev*, 22-26.
- Maroco, J. (2003). *Análise Estatística com utilização do SPSS* (2ª ed.). Lisboa: Edições Sílabo.
- Matijatko, V., Kis, I., Torti, M., Brkljacic, M., Rafal, R. B., Zvorc, Z., Mrljak, V. (2010). Systemic inflammatory response syndrome and multiple organ dysfunction syndrome in canine babesiosis. *Veterinarski Arhiv*, 80(5), 611-626.
- Mehta, C. R., & Patel, N. R. (1996). *SPSS Exact Tests 7.0 for Windows*. Chicago: Editor Spss inc.
- Meireles, J. A. F. S. (2008). Terapêutica e Profilaxia da Leishmaniose canina. In G. Santos-Gomes & I. P. Fonseca (Eds.), *Leishmaniose Canina* (pp. 93-103). Lisboa: Chaves Ferreira.
- Mekuzas, Y., Grandoni, L., Oliva, G., Manzillo, V. F., & Baneth, G. (2009). *Ehrlichia canis* and *Leishmania infantum* co-infection: a 3-year longitudinal study in naturally exposed dogs. *Clin. Microbiol. Infect.*, 15, 30-31.
- Miranda, S., Roura, X., Picado, A., Ferrer, L., & Ramis, A. (2008). Characterization of sex, age, and breed for a population of canine leishmaniosis diseased dogs. *Research in Veterinary Science*, 85, 35-38.
- Miró, G., Cardoso, L., Pennisi, M. G., Oliva, G., & Baneth, G. (2008). Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. *TRENDSs in Parasitology*, 24(8), 371-377.
- Moreno, A. M., Nieto, C. G., & Hernández, S. (1999). Leishmaniosis canina. In M. C. Campillo, F. A. Vázquez, A. R. Fernández, C. S. Acedo, S. H. Rodríguez & I. N. López-Cozar (Eds.), *Parasitologia Veterinária*. Madrid: McGraw-Hill Interamericana.
- Mumcuoglu, K. Y., Keysary, A., & Gilead, L. (2002). Mediterranean Spotted Fever in Israel: A Tick-Borne Disease. *IMAJ*, 4, 44-49.
- Natami, A., Sahibi, H., Lasri, S., Boudourna, M., Guessouss-Idrissi, N., & Rhalem, A. (2000). Serological, clinical and histopathological changes in naturally infected dogs with *Leishmania infantum* in the Khemisset province, Morocco. *Veterinary Research*, 31, 355-363.
- Neer, T. M., Breitschwerdt, E. B., Greene, R. T., & Lappin, M. R. (2002). Consensus Statement on Ehrlichial Disease of Small Animals from the Infectious Disease Study Group of The American College of Veterinary Internal Medicine. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 16, 309-315.
- Neer, T. M., & Harrus, S. (2006). Canine Monocytotropic ehrlichiosis and neorickettsiosis (*E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ruminantium*, *N. sennetsu*, and *N. risticii* infections). In C. E. Greene (Ed.), *Infectious diseases of the dog and cat* (3rd ed., pp. 203-216). Philadelphia: Elsevier, Inc.
- Nelson, R. W., & Couto, C. G. (2003). *Medicina Interna de Pequenos Animais*. São Paulo: Mosby.

- Nicholson, W. L., Allen, K. E., McQuiston, J. H., Breitschwerdt, E. B., & Little, S. E. (2010). The increasing recognition of rickettsial pathogens in dogs and people. *Trends in Parasitology*, 26(4), 205-212.
- Noli, C. (1999). Canine Leishmaniasis. *Waltham Focus*, 9(2), 16-24.
- OnLeish. (2008). OnLeish - Observatório Nacional das Leishmanioses Retrieved 2 de Fevereiro de 2010, 2010, from www.onleish.org
- Ozaki, L. S. (1996). Babesia in Domestic Animals: Molecular Biological Tools for Studying their Taxonomy and Life Cycle. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 91(Suppl.).
- Parola, P., Paddock, C. D., & Raoult, D. (2005). Tick-Borne Rickettsioses around the World: Emerging Diseases Challenging Old Concepts. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(4), 719-756.
- Pereira, M. A. M. (2008). Epidemiologia da leishmaniose canina. In G. Santos-Gomes & I. P. Fonseca (Eds.), *Leishmaniose Canina* (pp 41-52). Lisboa: Chaves Ferreira.
- Pereira da Fonseca, I. M. P. d., & Brito, M. T. V. d. (2008). Diagnóstico. In G. Santos-Gomes & I. P. Fonseca (Eds.), *Leishmaniose Canina* (pp. 83-92). Lisboa: Chaves Ferreira.
- Pestana, M. H., & Gageiro, J. N. (2005). *Análise de dados para ciências sociais - A complementaridade do SPSS* (4ª ed.). Lisboa: Edições Sílabo.
- Pinelli, E., Kilick-Kendrik, R., Wagenaar, J., Bernardina, W., Real, G. d., & Ruitenbergh, J. (1994). Cellular and humoral immune response in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infection and Immunity*, 62, 229-235.
- Pinelli, E., Rutten, V. P. M. G., & Ruitenbergh, E. J. (1999). Cellular immune responses in canine leishmaniasis. From Canine Leishmaniasis: an update. . *Proceedings of Canine Leishmaniasis Forum, Barcelona*, 60-64, 28-31 January.
- Ramsey, I. (2008). *BSAVA - Small Animal Formulary* (6th ed.). Glasgow: BSAVA - British Small Animal Veterinary Association.
- Raoult, D., & Parola, P. (2007). *Rickettsial Diseases*. London: informa healthcare.
- Rikihisa, Y. (1991). The Tribe Ehrlichiae and Ehrlichial Diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 4(3), 286-308.
- Rochette, F. (2003). *Los parásitos del perro y su control*. Barcelona: Veterinária Esteve.
- Roura, X. (2007). *Exposure to Arthropod-Borne Pathogens in Healthy or Leishmania infantum-Infected Dogs from Spain* Paper presented at the 2nd CVBD Symposium, Sicily, Italy.
- Roura, X., Breitschwerdt, E., Lloret, A., Ferrer, L., & Hegarty, B. (2005). Serological evidence of exposure to *Rickettsia*, *Bartonella* and *Ehrlichia* species in healthy or *Leishmania infantum*-infected dogs from Barcelona, Spain. *The International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*, 3(2), 129-137. [Cortesia de Professor Doutor Xavier Roura]

- Roura, X., Sanchez, A., & Ferrer, L. (1999). Diagnosis of canine leishmaniasis by polymerase chain reaction technique. *Veterinary Record*, 144, 262-264.
- Roze, M. (2005). Canine Leishmaniasis. A spreading disease. Diagnosis and treatment. *European Journal of Companion Animal Practice*, 15(1), 39-52.
- Sá, A. G., Cerqueira, A. M. F., O'Dwyer, L. H., Macieira, D. B., Abreu, F. S., Ferreira, R. F., Pereira, A., Velho, P. B. & Almosny, N. R. P. (2006). Detection and Molecular Characterization of *Babesia canis vogeli* From Naturally Infected Brazilian Dogs. *Intern J Appl Res Vet Med* 4(2), 163-168.
- Sales, K. G., Braga, F. R. R., Silva, A. C. F., Muraro, L. S., & Siqueira, K. B. (2007). Estudo retrospectivo (2006) da ehrlichiose canina no Laboratório do Hospital Veterinário da Universidade de Cuiabá. *Acta Scientiae Veterinariae*, 35(Supl 2), s555-s557.
- Schoeman, J. P. (2009). Canine babesiosis. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 76(59-68).
- Scola, B. L., & Raoult, D. (1997). Laboratory Diagnosis of Rickettsioses: Current Approaches to Diagnosis of Old and New Rickettsial Diseases. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(1), 2715-2727.
- Shaw, S. E., Day, M. J., Birtles, R. J., & Breitschwerdt, E. B. (2001). Tick-borne infectious diseases of dogs. *TRENDS in Parasitology*, 17, 74-80.
- Shipov, A., Klement, E., Reuveni-Tager, L., Waner, T., & Harrus, S. (2008). Prognostic indicators for canine monocytic ehrlichiosis. *Veterinary Parasitology*, 153, 131-138.
- Silva, M. M., Santos, A. S., Formosinho, P., & Bacellar, F. (2006). Carraças associadas a patologias infecciosas em Portugal. *Acta Médica Portuguesa*, 19, 39-48.
- Skotarczak, B. (2003). Canine ehrlichiosis. *Ann Agric Environ Med*, 10, 137-141.
- Solano-Gallego, L. (2009). Update on canine babesiosis: the European perspective. *Proceedings of the 4th Symposium of the CVBD World Forum, 25-28 March*, Bayer Animal Health, Seville, Spain.
- Solano-Gallego, L., Kidd, L., Trotta, M., Marco, M. D., Caldin, M., Furlanello, T., et al. (2006a). Febrile Illness Associated with *Rickettsia conorii* Infection in Dogs from Sicily. *Emerging Infectious Diseases*, 12(2), 1985-1988.
- Solano-Gallego, L., Koutinas, A., Miró, G., Cardoso, L., Pennisi, M. G., Ferrer, L., et al. (2009). Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, 165, 1-18.
- Solano-Gallego, L., Llull, J., Ramos, G., Riera, C., Arboix, M., Alberola, J., et al. (2000). The ibizian hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. *Veterinary Parasitology*, 90, 37-45.
- Solano-Gallego, L., Llull, J., Osso, M., Hegarty, B., & Breitschwerdt, E. (2006b). A serological study of exposure to arthropod-borne pathogens in dogs from northeastern Spain. *Veterinary Research*, 37, 231-244.

- Sousa, Higa, A. C., & Gerardi, D. G. (2004). Tratamento da ehrliquiose canina de ocorrência natural com Doxiciclina, precedida ou não pelo dipropionato de imidocarb. *Revista de Ciência Agroveterinárias*, 3(2), 126-130.
- Sousa, Nóbrega, S. D., Bacellar, F., & Torgal, J. (2003). Sobre a realidade da febre escarotodular em Portugal. *Acta Médica Portuguesa*, 16, 429-436.
- Strauss-Ayali, D., & Baneth, G. (2000). Canine Visceral Leishmaniasis *Recent Advances in Canine Infectious Diseases*. Ithaca, New York, USA: International Veterinary Information Service (IVIS).
- Taboada, J., & Lobetti, R. (2006). Babesiosis. In C. E. Greene (Ed.), *Infectious diseases of the dog and cat* (3rd ed., pp. 722-735). Philadelphia: Elsevier, Inc.
- Taboada, J., & Merchant (1997). Infecções por protozoários e outras causas. In S. J. Ettinger & E. C. Feldman (Eds.), *Tratado de Medicina Interna Veterinária* (4th ed., Vol. 1, pp. 554-572). São Paulo: Manole.
- Tomás, A. M., & Romão, S. F. (2008). Biologia do parasita. In G. Santos-Gomes & I. P. Fonseca (Eds.), *Leishmaniose Canina* (pp. 7-26). Lisboa: Chaves Ferreira.
- Trotz-William, L. A., & Trees, A. J. (2003). Systematic review of the distribution of the major vector-borne parasitic infections in dogs and cats in Europe. *Veterinary Record*, 152, 97-105.
- Uilenberg, G., Franssen, F. F. J., Perié, N. M., & Spanjer, A. A. M. (1989). Three groups of *Babesia canis* distinguished and a proposal for nomenclature. *The Veterinary Quarterly*, 11(1), 33-40. [Cortesia de Professor Doutor Gerrit Uilenberg]
- Warner, T. (2008). Hematopathological changes in dogs infected with *Ehrlichia canis*. *Veterinary Medicine*, 63(1).
- Warner, T., & Harrus, S. (2000). Canine Monocytic Ehrlichiosis (CME). In L. E. Carmichael (Ed.), *Recent Advances in Canine Infectious Diseases*: International Veterinary Information Service (www.ivis.org).
- World-Health-Organization (2004). The vector-borne human infectious of Europe: Their distribution and burden on public health Retrieved Nov, 4, 2010.
- Yin, S. (2007). *The Small Animal Veterinary Nerdbook* (Third ed.): CattleDog Publishing.
- Zahler, M., Schein, E., & Rinder, H. (1998). Characteristic genotypes discriminate between *Babesia canis* isolates of differing vector specificity and pathogenicity to dogs. *Parasitology Research*, 84, 544-548.
- Zygner, W., Gójska, O., Rapacka, G., Jaros, D., & Wedrychowicz, H. (2007a). Hematological changes during the course of canine babesiosis caused by large *Babesia* in domestic dogs in Warsaw (Poland). *Veterinary Parasitology*, 145, 146-151.
- Zygner, W., Rapacka, G., Gójska-Zygner, O., Dlugosz, E., & Wedrychowicz, H. (2007b). Biochemical abnormalities observed in serum of dogs infected with large *Babesia* in Warsaw (Poland). *Journal of Veterinary Sciences*, 10(4), 245-253.

Zygner, W., & Wedrychowicz, H. (2009). Influence of anaemia on azotaemia in dogs infected with *Babesia canis* in Poland. *Bull Vet Inst Pulawy*, 53, 663-668.

APÊNDICE I

Base de dados SPSS

NUMERO	IDADE	PESO	RAÇA	SEXO	DOENÇA1	DOENÇA2	SXDERMAT	PPESO	LINFAD	SXME	FEBRE
1	7	45	14	1	1	1	1	1	2	1	2
2	9	26,8	5	1	1	1	1	1	2	2	2
3	6	32,6	6	2	1	1	2	1	1	1	2
4	8	35,6	2	2	1	1	1	1	1	1	2
5	10	12	3	2	1	1	1	1	2	1	2
6	4	21,8	15	2	1	1	1	1	2	2	2
7	6	25,4	10	2	1	1	1	1	1	1	2
8	12	30	2	2	1	1	1	1	1	2	2
9	6	37,5	15	2	1	1	1	2	1	2	2
10	4	34,6	15	2	1	1	1	1	2	2	2
11	9		7	2	1	1	1	2	2	2	1
12	10	28	8	2	1	1	1	1	2	1	1
13	4	11,6	3		1	1	1	2	1	2	1
14	2	19,4	15	1	1	1	2	1	1	1	2
15	8		2	2	1	1	1	1	1	2	2
16	6	30	2	2	1	1	1	1	1	2	1
17	8	35	12	1	1	1	1	2	1	1	2
18	2	33	12	2	2	4	1	1	1	1	1
19	7	34,7	12	2	2	4	2	1	2	2	1
20	3	30	10	2	2	7	1	1	1	2	1
21	7	32,4	15	2	2	8	1	1	1	2	1
22	7	34	15	2	2	8	2	1	2	2	1
23	10	23	15	1	2	8	2	1	1	1	2
24	2	6	15	2	2	6	1	1	2	2	1
25	4		11	2	2	6	1	2	2	2	2
26	14	16,8	15	2	2	3	1	2	1	1	1
27	8	15	13	1	2	2	2	2	2	2	2
28		19,6	15	1	2	8	1	2	2	2	2
29	8	22,6	9	2	2	6	2	1	2	1	1
30	3	33,8	11	2	2	6	1	2	2	1	2
31	4	26,4	5	2	2	6	2	1	1	2	2
32	6	45	1	1	2	6	1	2	2	2	2
33	5	32	4	2	2	2	1	2	1	2	2
34	4	34	2	2	2	7	2	2	1	2	2
35	4		7	2	2	4	2	2	2	2	.

APÊNDICE I (continuação)

Base de dados SPSS

NUMERO	ANEMIA	PLAQ	NEUT	EOS	PT	ALB	RATIO	ALFA1	ALFA2	BETA	GAMA
1	1	4	2	3	1	3	3	3	2	2	1
2	1	4	2	2							
3	1	4	2	2	1	3	3	2	2	2	1
4	2	2	2	3	1	3	3	2	2	2	1
5	1	1	2	2	1	3	3	2	2	2	1
6	2	3	2	3	3	3	3	3	2	2	2
7	1	3	2	2	1	2	3	2	2	2	1
8	2	2	2	2	3	3	3	2	2	2	1
9	2	2	2	2	1	2	3	1	2	2	1
10	2	2	2	2	1	2	3	3	1	2	1
11	2	2	1	2	1	2	3	2	2	1	1
12	1	3	2	2	2	2	3	3	2	2	1
13	1	4	2	2	2	3	3	2	1	1	1
14	1	3	2	2	1	2	3	3	1	2	1
15	1	3	2	2	1	3	2	1	1	1	1
16	1	4	2	2	2	3	3	2	2	2	1
17	1	4	2	2	1	2	2	3	2	1	1
18	1	4	2	2	1	3	3	1	1	1	1
19	1	3	2	3	1	3	3	3	3	1	1
20	1	2	2	2	2	3	3	2	2	2	1
21	1	3	2	3							
22	2	3	2	3							
23	1	3	1	2	2	3	3	2	2	2	1
24	1	4	1	3	2	3	3	3	3	2	1
25	1	4	2	2	1	2	3	3	1	1	1
26	1	2	3	2	1	3	3	2	2	1	1
27	2	3	2	3	2	3	3	3	2	2	1
28	2	4	2	3	1	2	2	3	2	2	1
29	1	4	1	2	2	2	2	2	2	2	1
30	2	3	1	2	1	3	3	3	1	2	1
31	1	2	2	3	2	3	3	1	2	2	1
32	1	3	2	2	1	3	3	1	1	1	1
33	2	2	2	2	2	2	2	3	2	2	2
34	2	3	1	3	2	2	2	2	2	1	1
35	1	3	2	2	1	3	3	1	2	1	1

APÊNDICE I (continuação)

Base de dados SPSS

NUMERO	MES	HEMOGLOBINA	PLAQUETAS	PROTOTAIS	TEMPRECTAL	DOENÇA3
1	1	6,54	23500	8,30	38,5	
2	3	10,70	57400		38,8	
3	12	9,12	56800	9,80	38,8	
4	1	12,60	21800	8,90	38,0	
5	7	5,61	659000	6,00	38,3	
6	3	14,10	130000	5,10	38,4	
7	3	9,74	28800	7,50	38,6	
8	5	13,60	260000	4,90	38,7	
9	7	15,50	217000	9,00	38,9	
10	7	14,80	263000	7,60	38,3	
11	4	16,00	280000	8,10	39,3	
12	4	9,73	119000	7,20	39,1	
13	8	5,51	178000		39,3	
14	3	11,70	179000	8,40	38,6	
15	6	10,20	101000	8,50	38,7	
16	3	10,40	86700	7,10	39,3	
17	6	11,50	11200	8,20	38,5	
18	3	9,83	101000	9,50	39,6	4
19	8	9,16	168000	9,10	40,8	4
20	7	11,80	296000	6,80	40,5	7
21	7	7,25	15900		39,5	8
22	7	12,60	41000		40,0	8
23	5	4,50	92000	5,70	38,0	8
24	8	6,47	186000	5,70	39,2	6
25	6	8,68	143000	11,00	38,9	6
26	10	8,01	289000	8,80	39,3	3
27	1	15,30	127000	5,30	38,4	2
28	1	12,40	15700	10,60	38,2	8
29	2	9,30	189000	6,10	39,4	6
30	8	14,20	181000	8,60	38,8	6
31	11	5,61	223000	6,60	37,7	6
32	2	10,20	16000	7,30	38,8	6
33	3	18,50	346000	7,20	38,8	2
34	2	19,80	188000	6,80	38,6	7
35	7	9,20	113000	9,00		4

APÊNDICE II

Distribuição das raças, sexo, idade e peso pelos dois grupos.

GRUPO A (mono-infectados)				GRUPO B (co-infectados)			
Raça	Sexo	Idade (anos)	Peso (kg)	Raça	Sexo	Idade (anos)	Peso (kg)
S. Bernardo	f	7	45	Rottweiler	m	2	33
Doberman	f	9	26,8	Rottweiler	m	7	34,7
Golden Retriever	m	6	32,6	Perdigueiro Português	m	3	30
Boxer	m	8	35,6	Indeterminada	m	7	32,4
Cocker Spaniel	m	10	12	Indeterminada	m	7	34
Indeterminada	m	4	21,8	Indeterminada	f	10	23
Perdigueiro Português	m	6	25,4	Indeterminada	m	2	6
Boxer	m	12	30	Pitbull Terrier	M	4	
Indeterminada	m	6	37,5	Indeterminada	m	14	16,8
Indeterminada	m	4	34,6	Samoyedo	f	8	15
Husky Siberiano	m	9		Indeterminada	f		19,6
Pastor Alemão	m	10	28	Pastor Belga	m	8	22,6
Cocker Spaniel		4	11,6	Pitbull Terrier	m	3	33,8
Indeterminada	f	2	19,4	Doberman	m	4	26,4
Boxer	m	8	n/d	Boerbull	f	6	45
Boxer	m	6	30	Dálmata	m	5	32
Rottweiler	f	8	35	Boxer	m	4	34
				Husky Siberiano	m	4	

APÊNDICE III
Distribuição dos sinais clínicos pelos dois grupos

GRUPO A		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
		Sinais Gerais																
	Temperatura (°C)	38,5	38,8	38,8	38	38,3	38,4	38,6	38,7	38,9	38,3	39,3	39,1	39,3	38,6	38,7	39,3	38,5
	Prostração	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	S	S	N	N
	Anorexia	N	N	S	N	N	N	S	S	N	N	N	N	N	S	S	N	N
	Perda de peso	S	S	S	S	S	S	S	S	N	S	N	S	N	S	S	S	N
	Má condição corporal	S	N	N	N	S	S	S	N	N	N	N	S	N	S	N	N	N
	Mucosas pálidas	S	N	S	N	S	N	N	N	N	N	N	S	S	N	N	N	N
	Halitose	N	N	N	N	N	N	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	Exame clínico normal	N	S	N	N	N	N	N	N	S	S	S	N	N	N	N	N	N
	Desidratação	N	N	N	N	N	N	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	PU/PD	N	N	N	N	N	N	N	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	Secreção nasal	N	N	N	N	N	N	N	N	S	N	N	N	N	S	N	N	N
	Epistáxis	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		Sinais Dermatológicos																
Alopécia	Peri-ocular	N	S	N	N	N	N	S	N	N	N	N	N	S	N	N	N	N
	Focinho	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	S	N	N	N	N
	Corpo	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	S	S	N	N	N	N
	Membros	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

APÊNDICE III (continuação)

Seborreia	S	S	N	S	N	N	S	N	S	N	S	S	N	N	N	N	S
Calos cutâneos	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	S	N
Nódulos cutâneos	N	S	N	N	N	N	N	N	N	S	N	N	N	N	N	S	N
Feridas orelhas	N	N	N	S	N	S	N	N	S	N	N	N	N	N	N	N	N
Dermatite	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Hiperqueratose do nariz	N	N	N	N	N	N	S	S	N	N	N	N	N	N	S	N	N
Úlceras	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	S	N	N	N	N	N
Pêlo em mau estado	N	N	N	N	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Onicogribose	S	N	N	S	N	N	N	N	N	N	N	N	S	N	N	N	S
Sinais Oftalmológicos																	
Queratite	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	S	N	N	N	N	N
Conjuntivite	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	S	N	N
Opacidade córnea	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	S	N	N	N	N
Glaucoma	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	S	N	N	N	N
Sinais Cardiovasculares																	
Cansaço	N	N	N	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Sopro cardíaco	N	N	S	S	S	N	N	S	N	N	N	S	N	N	N	N	N
Sinais Gastrointestinais																	
Vômito	N	N	N	N	N	N	N	S	N	N	N	N	N	N	S	N	N
Diarreia	N	N	N	N	N	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

APÊNDICE III (continuação)

Sinais Viscerais																		
Linfadenopatia	Mandibular/ Pré-escapular	N	N	N	N	N	N	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	Poplíteos	N	N	N	N	N	N	N	N	S	N	N	N	N	N	N	N	N
	Generalizada	N	N	S	S	N	N	N	S	N	N	N	N	S	S	S	S	S
	Esplenomegália	N	N	N	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	Sinais músculo-esqueléticos																	
Atrofia muscular	Crotófitas	N	N	S	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	S
	Membros posteriores	N	N	N	S	N	N	N	N	N	N	N	S	N	N	N	N	N
	Generalizada	S	N	N	N	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Claudicação	Membros Anteriores	N	N	N	N	N	N	N	N	N	S	N	N	N	S	N	N	S
	Membros Posteriores	N	N	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Dor articular	Membros Anteriores	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	S	N	N	N
	Membros posteriores	N	N	S	S	N	N	S	N	S	N	N	S	N	N	N	N	N
	Dificuldade de locomoção	S	N	N	N	N	N	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

APÊNDICE III (continuação)

	Diarreia	N	S	N	N	N	N	S	N	N	N	N	N	N	N	S	N	N	N
	Sinais Viscerais																		
Linfadenopatia	Mandibular/ Pré-escapular	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	S	N	N	N	N
	Poplíteos	N	N	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	Generalizada	S	N	N	S	N	S	N	N	S	N	N	N	N	S	N	S	S	N
	Esplenomegália	S	N	N	N	N	N	N	N	S	N	N	N	N	S	N	N	N	N
	Sinais músculo-esqueléticos																		
Atrofia muscular	Crotófitas	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	S	N	N	N	N	N	N
	Membros posteriores	N	N	N	N	N	N	N	N	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	Generalizada	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	S	N	N	N	N	N	N
Claudicação	Membros Anteriores	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	S	S	N	N	N	N	N
	Membros Posteriores	N	N	N	N	N	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Dor articular	Membros Anteriores	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	S	S	N	N	N	N	N
	Membros posteriores	N	N	N	N	N	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	Dificuldade de locomoção	N	N	N	N	N	S	N	N	S	N	N	S	S	N	N	N	N	N

APÊNDICE IV

Diagnóstico Serológico

Grupo A (mono-infectados)					
Pesquisa	Método utilizado	<i>Leishmania infantum</i>		Mês	
		+/-	Título		
1	<i>Leishmania sp.</i>	PCR	+	PCR	Janeiro
2	<i>Leishmania sp.</i>	IFI	+	240	Março
3	<i>Leishmania sp.</i>	IFI	+		Dezembro
4	<i>Leishmania sp.</i>	IFI	+	> 320	Janeiro
5	<i>Leishmania sp.</i>	IFI	+	160	Julho
6	<i>Leishmania sp.</i>	IFI	+	160	Julho
7	<i>Leishmania sp.</i>	IFI	+	240	Março
8	<i>Leishmania sp.</i>	IFI	+	160	Maior
9	<i>Leishmania sp.</i>	IFI	+	> 320	Julho
10	<i>Leishmania sp.</i>	IFI	+	160	Março
11	<i>Leishmania sp.</i>	IFI	+	160	Abril
12	<i>Leishmania sp.</i>	IFI	+	160	Abril
13	<i>Leishmania sp.</i>	IFI	+	320	Agosto
14	<i>Leishmania sp.</i>	IFI	+	160	Março
15	<i>Leishmania sp.</i>	IFI	+	> 320	Junho
16	<i>Leishmania sp.</i>	IFI	+	240	Março
17	<i>Leishmania sp.</i>	IFI	+	160	Junho

Grupo B (co-infectados)									
Método utilizado	<i>Leishmania infantum</i>		<i>Babesia canis</i>		<i>Ehrlichia canis</i>		<i>Rickettsia conorii</i>		Mês
	+/-	Título	+/-	Título	+/-	Título	+/-	Título	
18	IFI	+	320	-	+	80	+	80	Março
19	IFI	+	160	-	-		+	*	Agosto
20	IFI	+	160	-	fb	+	+	*	Julho
21	IFI	+	160	+	*	+	+	*	Julho
22	IFI	+	280	+	*	+	+	*	Julho
23	IFI	+	160	+	*	+	+	*	Maior
24	IFI	+	160	-	-		+	*	Agosto
25	IFI	+	160	+	Fr	-	+	80	Junho
26	IFI	+	*	-	+		-		Outubro
27	IFI	+	240	+	*	-	fb	-	Janeiro
28	IFI	+	160	+	*	+	*	+	Janeiro
29	PCR/IFI	+	PCR	+	*	-	+	80	Fevereiro
30	IFI	+	160	+	Fr	-	+	*	Agosto
31	IFI	+	160	+	*	-	+	*	Novembro
32	IFI	+	160	+	*	-	+	*	Fevereiro
33	IFI	+	160	+	*	-	-		Março
34	IFI	+	160	+	*	-	-		Fevereiro
35	IFI	+	> 320	-	-		+	> 1280	Julho

APÊNDICE V

Valores de hemograma, bioquímicas e proteinograma dos animais dos dois grupos

HEMOGRAMA (GRUPO A)																	
Parâmetros (valores de referência)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Eritrócitos (5,5 - 8,5x10 ⁶ /μL)	3,00	4,99	4,42	5,18	2,37	6,05	4,44	5,43	6,65	6,63	6,52	4,54	2,93	5,23	4,32	4,45	4,92
Plaquetas (200 - 500 x 103/μL)	23,5	57,4	56,8	218,0	659,0	130,0	143,0	260,0	217,0	263,0	280,0	119,0	178,0	179,0	101,0	86,7	11,2
Hemoglobina (12 - 18 g/dL)	6,54	10,70	9,12	12,60	5,61	14,10	9,74	13,60	15,50	14,80	16,00	9,73	5,51	11,70	10,20	10,40	11,50
Hematócrito (37 - 55%)	21,7	32,1	29,9	39,5	17,5	41,3	28,8	42,9	47,6	46,3	48	29,2	17,7	34,6	31,6	33,2	36,2
VCM (60 – 77 fL)	72,3	64,2	67,6	76,3	73,8	68,3	64,8	78,9	71,6	69,8	73,6	64,2	60,3	66,1	73,3	74,6	73,6
HCM (19,5 – 24,5 pg)	21,8	21,4	20,6	24,3	23,7	23,2	22	25,1	23,4	22,3	24,5	21,4	18,8	22,3	23,7	23,4	23,4
CHCM (32 – 36 g/dL)	30,2	33,3	30,5	31,9	32,1	34	33,9	31,8	32,6	32	33,3	33,4	31,1	33,8	32,3	31,4	31,8
Leucócitos (6 – 17x103/μL)	6,22	5,25	5,1	11,9	11,4	9,25	6,5	9,09	7,65	5,08	17	6,79	11,7	13,3	7,63	12,4	5,4
NNS (0-300/μL)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NS (3000- 11500/μL)	5100	4099	3284	9282	8664	7308	5265	7363	4431	3505	13600	4685	10246	10773	5265	8680	3726
Linfócitos (1000 – 4800/μL)	249	840	1173	2023	1140	185	390	1182	2674	914	2380	1086	819	931	992	2480	864
Monócitos (150 – 1350/μL)	871	210	459	595	1140	1758	650	369	382	508	510	815	468	1463	687	992	108
Eosinófilos (100 – 1250/μL)	0	105	204	0	456	0	195	182	153	152	510	204	117	133	687	248	702
Basófilos (raros)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Observações	Agregação plaquetária	Agregação plaquetária	Agregação plaquetária	Agregação plaquetária	Eritrócitos nucleados raros. Anisocitose e policromasia 3+.			Normocitose e normocromasia			Agregação plaquetária			Eritrócitos nucleados Anisocitose e policromasia			Agregação plaquetária Anisocitose e policromasia 1+

APÊNDICE V (continuação)

BIOQUÍMICA SANGUÍNEA (GRUPO A)																	
Parâmetros (valores de referência)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
ALT (10-100 U/L)	67		38	133	162	< 10	10	66	42	19	215	30	64	12		39	< 10
ALKP (23-212 U/L)	74		142	55	31	50	79	32	34	51	202	54	145			59	50
BUN (7-27 mg/dL)			33	14	29	81	> 130	54	11	15	16	14	31	14		41	81
CREA (0,5-1,8 mg/dL)	1,1		1,8	1,2	0,7	3,7	7,1	1,7	1,3	1	1,2	0,9	1,7	1		2,4	3,7
GLU (77-125 mg/dL)	100		103		98	125	124	102	100	112		104	102	124		122	125
ALB (2,7-3,8 g/dL)						1,7	2,8	1,4					2,1				1,7
Colesterol (110-320 mg/dL)							273	320		169				243			
Cálcio (7,9-12 mg/dL)								8,4									

PROTEINOGRAMA (GRUPO A)																	
Parâmetro (valores de referência)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Albumina (2,26-4,31 g/dL)	1,57		1,84	2,19	1,4	1,7	2,3	1,3	2,38	2,70	2,26	2,50	7,49	2,40	15,08	1,80	3,00
α1 (0,32 - 0,75 g/dL)	0,30		0,36	0,67	0,4	0,2	0,4	0,37	0,83	0,20	0,34	0,10	4,19	0,20	6,94	0,50	0,20
α2 (0,5-1,17 g/dL)	0,65		1	1,03	0,7	0,8	0,9	0,77	0,58	1,60	0,79	1,00	9,78	2,00	10,26	0,70	0,60
β (0,93-2,0 g/dL)	1,46		1,42	1,94	1,3	1,1	1,6	0,93	1,90	1,50	2,02	1,60	31,34	1,10	17,85	1,40	2,20
γ (0,39-1,02 g/dL)	4,32		5,18	3,06	2,2	0,6	2,2	1,56	3,29	1,60	2,70	2,00	84,20	3,00	35,82	2,50	2,20
Proteínas totais (5,2 - 7,2 g/dL)	8,30		9,80	8,90	6,00	5,10	7,50	4,90	9,00	7,60	8,10	7,20	127,00	8,40	85,70	7,10	8,20
Ratio A/G (0,6 - 1,1 %)	0,23		0,23	0,33	0,30	0,50	0,50	0,36	0,36	0,50	0,39	0,5	0,06	0,40	0,81	0,40	0,60
Globulinas totais													119,51		70,62		

APÊNDICE V (continuação)

HEMOGRAMA (GRUPO B)																		
Parâmetros (valores de referência)	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
Eritrócitos (5,5 - 8,5x10 ⁶ /μL)	4,05	3,84	4,97	3,09	5,64	2,01	2,97	2,46	3,37	6,83	5,4	4,04	5,69	2,73	4,52	7,57	8,5	4,17
Plaquetas (200 - 500 x 103/μL)	101	168	296	15,9	41	92	186	143	289	127	15,7	189	181	223	16	346	188	113
Hemoglobina (12 - 18 g/dL)	9,83	9,16	11,8	7,25	12,6	4,51	6,47	8,68	8,01	15,3	12,4	9,3	14,2	5,61	10,2	18,5	19,8	9,2
Hematócrito (37 - 55%)	30	28,9	35,8	23	39	14	21,3	30	23,6	47,9	36,3	27,9	43,3	17,8	31,7	55,7	58,5	28,6
VCM (60 - 77 fL)	74,1	75,4	72	74,4	69	69,4	71,6	67,2	70	70,1	67,2	69	76,2	65,1	78,3	73,6	68	68,6
HCM (19,5 - 24,5 pg)	24,3	23,9	23,7	23,4	22,4	22,4	21,7	19,4	23,7	22,4	23	23	24,9	20,5	22,5	24,4	23	22
CHCM (32 - 36 g/dL)	32,8	31,7	33	31,5	32,4	32,3	30,2	28,8	33,9	32	34,2	33,3	32,7	31,5	32	33,2	33,8	32,1
Leucócitos (6 - 17x103/μL)	7,24	11,9	7,4	4,18	11,5	21,7	15	8,44	3,47	8,54	14,2	24	18,3	9,75	5,02	10,4	20,4	9,98
NNS (0-300/μL)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NS (3000- 11500/μL)	4199	10591	5476	3386	3910	16275	11550	5655	2984	6576	4970	18480	14091	7703	4267	8424	17544	7285
Linfócitos (1000 - 4800/μL)	2462	1071	592	627	7015	3906	3000	1688	208	1537	8804	2160	2745	658	502	1040	1020	1497
Monócitos (150 - 1350/μL)	290	238	510	125	575	1085	450	675	174	427	426	2640	915	390	151	520	1836	299
Eosinófilos (100 - 1250/μL)	290	0	814	42	0	434	0	422	104	0	0	720	549	0	100	416	0	898
Basófilos (raros)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Observações	Agregação plaquetária Raros erit nucleados						Anisocitose e policromasia. Erit nucleados		Agregação Plaquetária		Agregação plaquetária Normocitose e normocromasia		Agregação plaquetária		Agregação plaquetária			

APÊNDICE V (continuação)

BIOQUÍMICA SANGUÍNEA (GRUPO B)																		
Parâmetros (valores de referência)	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
ALT (10-100 U/L)	26	18				60	51	106	53	>>					< 10	55		
ALKP (23-212 U/L)	155	129				90	107	74		83				59	59	20		
BUN (7-27 mg/dL)	21	9				66	19	16	19	115				34	25	17		
CREA (0,5-1,8 mg/dL)	1,2	1,4				1,3	0,6	1,4	0,6	3,7				2,4	1,4	1,7		
GLU (77-125 mg/dL)	104	108				125				115				136	104			
ALB (2,7-3,8 g/dL)						1,6			2,7					1,8				
Colesterol (110-320 mg/dL)														211				
Cálcio (7,9-12 mg/dL)																		

PROTEINOGRAMA (GRUPO B)																		
Parâmetro (valores de referência)	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
Albumina (2,26-4,31 g/dL)	18,32	22,6%	32,50%			1,60	0,95	3,10	2,20	1,39	3,80	2,30	2,10	1,30	2,00	3,57	2,58	16,20g/L
$\alpha 1$ (0,32 - 0,75 g/dL)	7,16	3,2%	5,90%			0,33	0,22	0,20	0,37	0,19	0,30	0,40	0,10	1,40	0,50	0,30	0,41	6,84 a
$\alpha 2$ (0,5-1,17 g/dL)	16,41	6,1%	11,30%			0,74	0,39	1,20	0,66	0,85	1,00	1,10	1,30	0,80	0,60	0,71	0,59	8,37
β (0,93-2,0 g/dL)	15,55	28,2%	23,10%			1,24	1,66	2,90	2,20	1,09	1,00	1,20	1,70	1,30	1,70	1,69	2,10	17,55
γ (0,39-1,02 g/dL)	37,97	39,9%	27,20%			1,79	2,48	3,60	3,37	1,78	4,50	1,10	3,20	1,70	2,50	0,93	1,31	41,04
Proteínas totais (5,2 - 7,2 g/dL)	95,40	9,1	6,80			5,70	5,70	11,00	8,80	5,30	10,60	6,10	8,60	6,60	7,30	7,20	6,80	90,00
Ratio A/G (0,6 - 1,1 %)	0,24	0,29%	0,48%			0,39	0,20	0,39	0,33	0,36	0,60	0,60	0,40	0,20	0,40	0,99	0,70	0,22
Globulinas totais	77,08																	73,80

APÊNDICE VI

Teste U Mann-Whitney para as variáveis estudadas

Tipo de Infecção	Idade – Ranks		
	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Mono-infecção	17	20,03	340,50
Co-Infecção	17	14,97	254,50
Total	34		

Idade – Test Statistic ^b	
Mann Whitney U	101,500
Wilcoxon W	254,500
Z	-1,494
Asymp.Sig (2-tailed)	0,135
Exact Sig [2*(1-tailed Sig.)]	0,140 ^a

- a. Not corrected for ties
b. Grouping variable: Tipo de infecção

Tipo de Infecção	Peso – Ranks		
	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Mono-infecção	15	16,57	3248,50
Co-Infecção	16	15,47	247,50
Total	31		

Peso – Test Statistic ^b	
Mann Whitney U	111,500
Wilcoxon W	247,500
Z	-0,336
Asymp.Sig (2-tailed)	0,737
Exact Sig [2*(1-tailed Sig.)]	0,740 ^a

- a. Not corrected for ties
b. Grouping variable: Tipo de infecção

Tipo de Infecção	Hemoglobina – Ranks		
	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Mono-infecção	17	19,15	325,50
Co-Infecção	18	16,92	304,50
Total	35		

Hemoglobina – Test Statistic ^b	
Mann Whitney U	133,500
Wilcoxon W	304,500
Z	-0,644
Asymp.Sig (2-tailed)	0,520
Exact Sig [2*(1-tailed Sig.)]	0,525 ^a

- a. Not corrected for ties
b. Grouping variable: Tipo de infecção

APÊNDICE VI (continuação)

Plaquetas – Ranks			
Tipo de Infecção	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Mono-infecção	17	17,15	291,50
Co-Infecção	18	18,81	338,50
Total	35		

Plaquetas– Test Statistic ^b	
Mann Whitney U	138,500
Wilcoxon W	291,500
Z	-0,479
Asymp.Sig (2-tailed)	0,632
Exact Sig [2*(1-tailed Sig.)]	0,636 ^a

- a. Not corrected for ties
b. Grouping variable: Tipo de infecção

Proteínas Totais – Ranks			
Tipo de Infecção	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Mono-infecção	15	15,80	237,00
Co-Infecção	16	16,19	259,00
Total	31		

Proteínas Totais – Test Statistic ^b	
Mann Whitney U	117,000
Wilcoxon W	237,000
Z	-0,119
Asymp.Sig (2-tailed)	0,906
Exact Sig [2*(1-tailed Sig.)]	0,922 ^a

- a. Not corrected for ties
b. Grouping variable: Tipo de infecção

APÊNDICE VII – Actividades desenvolvidas durante o estágio curricular

Caso Clínico I

“Ofélia” - Felino, fêmea, raça Europeu Comum, 4 anos de idade. Abscesso cervical recidivante devido a presença de corpo estranho (agulha).

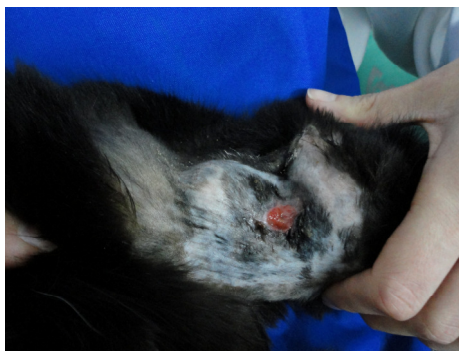


Figura 1 – Abscesso cervical

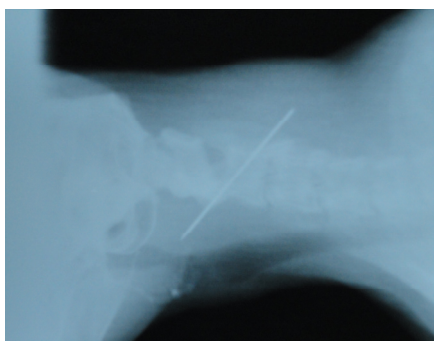


Figura 2 – Radiografia da zona cervical em decúbito lateral direito

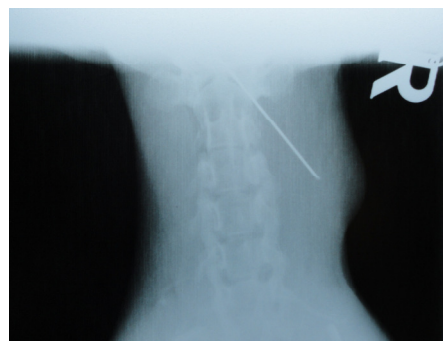


Figura 3 – Radiografia da zona cervical em decúbito ventral

Caso Clínico II

“Catarina” – Felino, fêmea, raça Europeu Comum, 3 anos de idade. História de contacto bucal com *Thaumetopoea pityocampa*, vulgarmente conhecido como processionária ou lagarta do pinheiro



Figuras 4 e 5 - Lesões provocadas pelo contacto com a lagarta do pinheiro

Caso Clínico III

Canídeo, macho, sem raça definida, 1 semana de idade. Presença de malformações congénitas, nomeadamente presença de lábio leporino e fenda do palato.



Figura 6 – Lábio leporino



Figura 7– Fenda palatina

Caso Clínico IV

“Maggie” - Canídeo, fêmea, raça S. Bernardo, 5 anos de idade. Urólito renal. Nefrotomia para remoção de cálculo.

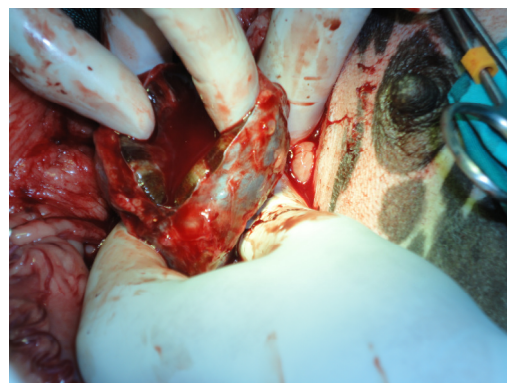
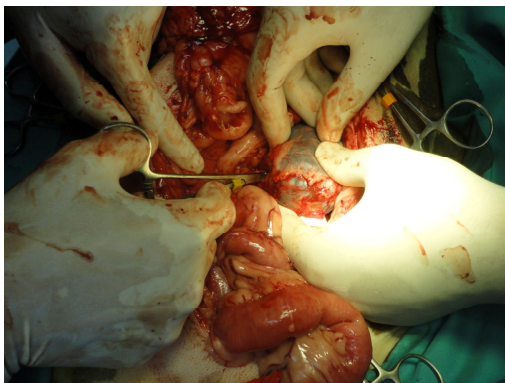


Figura 8 e 9 – Acesso à cavidade piélica pelo bacinete; nefrectomia

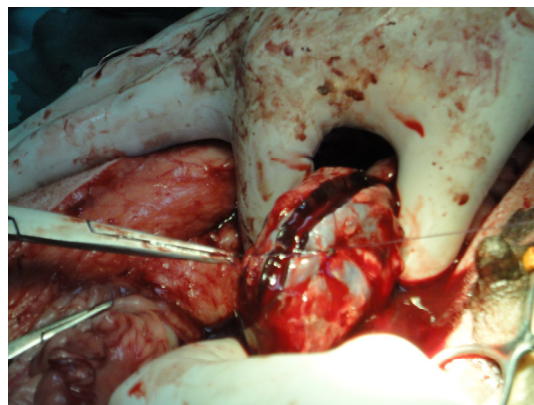


Figura 10 – Nefrorrafia

Caso Clínico V

“Rex” - Canídeo, macho, sem raça definida 6 anos. Otohematoma com resolução cirúrgica.



Figura 11 - Resolução cirúrgica de otohematoma

Caso Clínico VI

Canídeo, macho, raça Setter Irlandês, 8 anos de idade, História de atropelamento. Reconstrução cirúrgica de membro anterior direito, ao nível distal.



Figura 12 – Dia 0 – membro anterior direito



Figura 13 - Dia 3 – membro anterior direito



Figura 14 – Dia 7 – membro anterior direito



Figura 15 – Dia 30 – membro anterior direito

Caso Clínico VII

“Boris” - Canídeo, macho não castrado, raça Labrador Retriever, 7 anos de idade. Sertolinoma e quistos paraprostáticos. Excisão de testículo esquerdo intrabdominal.

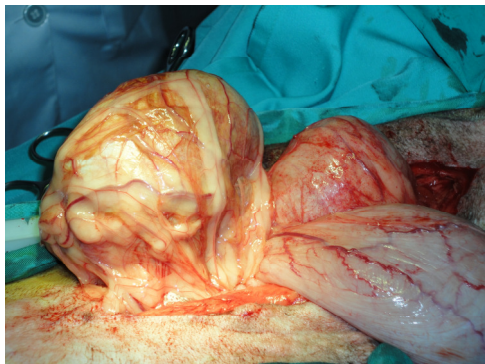


Figura 16 – Tumor testicular esquerdo

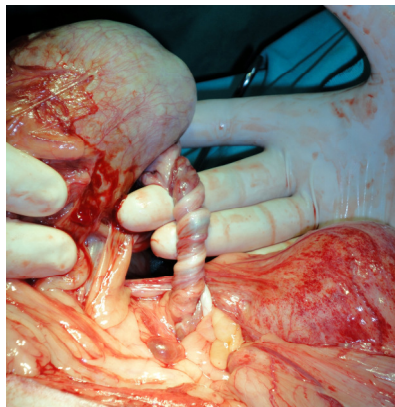


Figura 17 – Presença de tumor e torção no testículo esquerdo

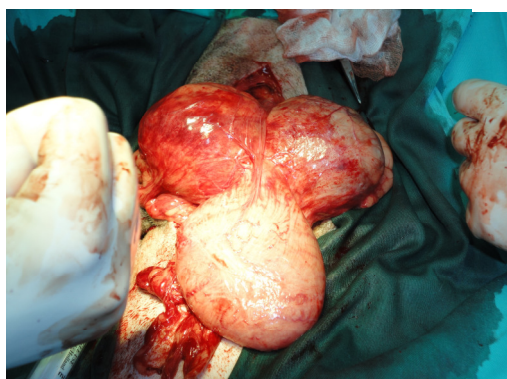


Figura 18 – Quistos paraprostáticos



Figura 19 – Drenagem de quistos paraprostáticos

Caso Clínico VIII

“Didi” – canídeo, fêmea, raça Pointer Inglês, 8 anos de idade. Piómetra com resolução cirúrgica: Ovariohisterectomia

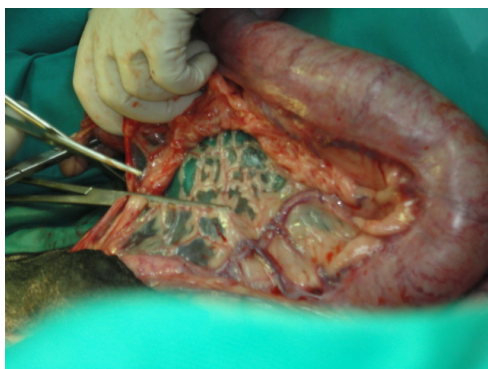


Figura 20 e 21 – Ovariohisterectomia.

ANEXO I

Valores de referência do hemograma



LABORATÓRIO DE ANÁLISES CLÍNICAS

PROFESSOR M. BRAÇO FORTE

HEMOGRAMA

ID: 15745

Nº de Análise:

Recebido em:

Requisitado por:

Nome do Proprietário:

Morada:

Código Postal

Telefone: 0

Fax: 0

Espécie Canina Nome do Animal:

Sexo:

Idade: 0

Raça:

Material enviado:

Nº de amostras 0 Data da colheita:

Qualidade da amostra:

RESULTADOS

	<i>Unidades</i>	<i>Valores de referência</i>
Leucócitos:	$\times 10^3 / \mu\text{L}$	6 - 17
Eritrócitos:	$\times 10^6 / \mu\text{L}$	5,5 - 8,5
Plaquetas:	$\times 10^3 / \mu\text{L}$	200-500
Hemoglobina:	g/dl	12 - 18
Hematócrito	%	37 - 55
VCM:	fl	60 - 77
HCM:	pg	19,5 - 24,5
CHCM:	g/dl	32 - 36

	%	Valores Absolutos	%	Valores Absolutos
Neutrófilos não segmentados			0 - 3	0-300 / μL
Neutrófilos segmentados:			60 - 77	3000-11500 / μL
Linfócitos:			12 - 30	1000-4800 / μL
Monócitos:			3 - 10	150-1350 / μL
Eosinófilos:			2 - 10	100-1250 / μL
Basófilos:			raros	raros

Observações:

O Responsável

Av. da Universidade Técnica - 1300 477 Lisboa - Tel. 21 365 28 00 - Ext. 1324 - Fax. 21 365 28 97

ANEXO II

Valores de referência do proteinograma

RESULTADOS

Folha de Trabalho Nº



Nome
Veterinário
Morada
Telefone:
Fax
Envia Resultados

Data:

No. Cliente:

Dados do Animal

Animal:
Espécie:
Raça:
Microchip:
Idade:
Amostra:

Proprietário:

Análise	Designação	Resultado	Unid.	Ref.	Observações
H)PROTEINOGRAMA	Proteinograma				
PTG	Albumina#		g/dl	2,26 - 4,31	
ALB#	Albumina %		%	41 - 56	
ALB PERC	Alfa-1		g/dl	0,32 - 0,75	
ALFA1	Alfa-1%		%	5,9 - 9,8	
ALFA1 #	Alfa-2		g/dl	0,50 - 1,17	
ALFA2	Alfa-2%		%	9,0 - 15,2	
ALFA2 PERC	Beta		g/dl	0,93 - 2,0	
BETA	Beta%		%	16,2 - 28	
BETA PERC	Gama		g/dl	0,39 - 1,02	
GAMA	Gama %		%	7 - 13,3	
GAMA PERC	Ratio (A/G)		g/dl	0,6 - 1,1	
RATIO (A/G)	Prot. Totais		g/dl	5,5 - 7,5	
P.TOTAIS					

Observações:

Data de fecho:

Q. ANALISAR

Documento Processado por computador

DNAtech, Lda

Estrada do Paço do Lumiar, 22

1649-038 LISBOA

Página de

ANEXO III

Valores de referência para *Leishmania infantum*

RESULTADOS

Folha de Trabalho Nº



Nome
Veterinário
Morada
Telefone:
Fax
Envia Resultados

Data:

No. Cliente:

Dados do Animal

Animal:
Espécie:
Raça:
Microchip:
Idade:
Amostra:

Proprietário:

Análise	Designação	Resultado	Un.	Ref.	Observações
G)IMUNOLOGIA LEISH4TIT TIT80 TIT160 TIT240 TIT320	Leishmaniose 4 tit Titulação 1/80 Titulação 1/160 Titulação 1/240 Titulação 1/320				Critério de valorização >160

Observações:

Data de fecho:

ANÁLISE

ANEXO IV

Valores de referência para hemoparasitas

RESULTADOS

Folha de Trabalho Nº



Nome
Veterinário
Morada
Telefone:
Fax
Envia Resultados

Data:

No. Cliente:

Dados do Animal

Animal:
Espécie:
Raça:
Microchip:
Idade:
Amostra:

Proprietário:

Análise	Designação	Resultado	Unidade	Ref.	Observações
G) IMUNOLOGIA					
P.HEMOPARASITAS	Perfil de Hemoparasitas				
BCANIS	Babesia canis				Critério valorização >1/32
EHRlichia	Ehrlichia canis				Critério de valorização >1/50
RICKETSIACONORI	Rickettsia Conorii				Critério de valorização >1/40
TIT40	Titulação 1/40				
TIT80	Titulação 1/80				

Observações:

Data de fecho:

O ANALISTA